



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER



**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DO LEITE MATERNO PELO
AGROTÓXICO GLIFOSATO EM PUÉRPERAS ATENDIDAS EM MATERNIDADES
PÚBLICAS DO PIAUÍ**

Inácio Pereira Lima

TERESINA – PI

2017

INÁCIO PEREIRA LIMA

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DO LEITE MATERNO PELO
AGROTÓXICO GLIFOSATO EM PUÉRPERAS ATENDIDAS EM MATERNIDADES
PÚBLICAS DO PIAUÍ

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde da Mulher.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. José de Sousa Lima Neto

TERESINA – PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde
Serviço de Processamento Técnico

L732a Lima, Inácio Pereira.
Avaliação da contaminação do leite materno pelo agrotóxico glifosato em puérperas atendidas em maternidades públicas do Piauí / Inácio Pereira Lima. –
– Teresina, 2017.
66 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher, 2017.
“Orientação : Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira.”
Bibliografia

1. Leite Materno. 2. Contaminação. 3. Agrotóxico. 4. Herbicida. I. Título.

CDD 664

INÁCIO PEREIRA LIMA

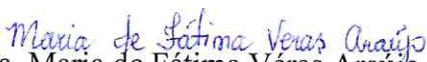
AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DO LEITE MATERNO PELO
AGROTÓXICO GLIFOSATO EM PUÉRPERAS ATENDIDAS EM MATERNIDADES
PÚBLICAS DO PIAUÍ

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde da Mulher, pela seguinte Banca Examinadora:



Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira
Orientadora/ CCS /Depto. Biofísica e Fisiologia/UFPI

Prof. Dr. José de Sousa Lima Neto
Coorientador/Coordenação de Farmácia/UFPI


Profa.Dra. Maria de Fátima Veras Araújo
CCN/UESPI


Profa. Zenira Martins Silva
Membro titular externo - SESAPI

TERESINA – PI

2017

AGRADECIMENTOS

Ao final desta etapa de estudo, chega o momento de reconhecer e agradecer àqueles que deram sua parcela de contribuição para a realização desta pesquisa. Neste sentido sinto a honra de agradecer instituições e pessoas que tanto colaboraram, como destaco a seguir:

À Universidade Federal do Piauí, Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Diretoria do Centro de Ciências da Saúde, e a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher pela oportunidade e apoios recebidos;

À Secretaria Estadual de Saúde do Piauí por ser uma das instituições parceiras na realização deste Mestrado, ter oportunizado meu acesso e ter colaborado com a cessão de motorista e veículo durante a etapa de trabalho de campo nos municípios de Oeiras e Uruçuí;

À minha família, descendentes, pares e ascendentes, por me apoiar em todos os momentos e desafios proporcionados nesta vida;

À minha orientadora, Profa. Rita de Cássia Meneses Oliveira pelas orientações recebidas durante este mestrado, sempre acessível e colaboradora quando solicitada;

Ao Coorientador, Prof. Dr. José de Sousa Lima Neto pelo empenho e condução dos trabalhos de escolha e desenvolvimento do método de análise cromatográfico, assim como pelas análises das amostras de leite materno, extensivo aos colaboradores do laboratório LAGO Alek André Costa de Sousa e Iolanda Souza do Carmo;

À Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho pelo apoio na viabilização do laboratório, equipamentos e insumos necessários à análise das amostras biológicas deste estudo;

Às colegas da primeira turma do Mestrado Profissional em Saúde da Mulher pelo tempo de convivência e mútua colaboração durante as atividades do curso;

Ao Diretor da Maternidade Dona Evangelina Rosa, médico José Araújo Brito e equipe do banco de leite;

Ao Diretor do Hospital Regional Dirceu Arcoverde de Uruçuí Edmar José de Figueiredo e aos servidores Michele Soares de Sousa e Raimunda Albino de Moura;

À Vereadora de Uruçuí Glaicy Maria Teixeira Brito de Araújo pelo reconhecimento da importância do estudo e contatos com algumas puérperas participantes;

À Secretária Municipal de Saúde de Uruçuí Nilza Machado Beker e equipe de profissionais municipais: enfermeira Thaís Melo e Silva Coordenadora municipal de atenção básica e ao grupo de agentes comunitários de saúde, em especial: Justina Ribeiro de Sousa, Maria de Jesus Ribeiro, Eliete Silva Pereira e Afonso Martins de Sousa;

Ao Coordenador Regional de Saúde de Uruçuí Reginaldo Arrais Pinto Rodrigues e equipes de servidores: Justino José Martins e Maria Alice Santana;

À Secretária Municipal de Saúde de Oeiras Auridene Maria da Silva Moreira de Freitas Tapety, e aos profissionais de saúde do município: enfermeira Alexandra da Rocha Fontes, coordenadora municipal de saúde da mulher, enfermeiros Valdenir Fontes, Denise Bezerra, técnico Francisco Lemontier Martins de Sousa e aos agentes comunitários de saúde: Zélia Maria de Araújo Santos, Dalva Maria Carvalho, Luziane Pimentel, Aline Gonçalves Lopes, Maria Alice de Paula Quadros, Solange Araújo Brandão do Nascimento, Zilma Venâncio da Silva e Socorro Borges;

À Diretora do Hospital Regional Deolindo Couto e ao Enfermeiro e gerente de enfermagem Valdenir Fontes pelo acesso e apoio na realização da pesquisa de campo;

Ao motorista da Secretaria Estadual de Saúde Rivaldivio de Sousa Vieira pela disposição e colaboração durante os deslocamentos para a coleta de material da pesquisa.

A todos(as), sinceros agradecimentos.

LIMA, I. P. **Avaliação da contaminação do leite materno pelo agrotóxico glifosato em puérperas atendidas em maternidades públicas do Piauí.** 2017, 66p. Dissertação de Mestrado Profissional. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher – CCS/UFPI.

RESUMO

O glifosato é o agrotóxico de maior risco potencial para a saúde humana por ser o mais comercializado no mundo, no Brasil e no Piauí. Baseando-se nessa realidade, este estudo teve como objetivo avaliar a contaminação de leite materno pelo agrotóxico glifosato em puérperas atendidas em maternidades públicas do Piauí. Adotou-se um desenho de estudo correlacional descritivo e de corte transversal aplicado nos municípios de Teresina com 164 participantes, Oeiras com 27 e Uruçuí com 13 participantes. Foi desenvolvido um método de análise laboratorial das amostras de leite materno aplicado à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a fotodiodo de detecção por radiação ultravioleta, mediante a reação de derivatização do glifosato e seu metabólito ácido aminometilfosfônico pelo cloroformato de 9-fluorenilmetila. Após testes experimentais o método escolhido para a análise das amostras de leite materno foi o gradiente isocrático com uso do solvente acetronitrila a 10%. Foi testado em triplicata e ao passar pelo detector foi demonstrada a presença do glifosato e do ácido aminometilfosfônico em picos cromatográficos na faixa de 263 nanômetros(nm), com coeficiente de correlação(r) igual a 0,9993 que originou a construção da curva de calibração e a confirmação de sua eficiência e linearidade. A análise das amostras de leite materno limitou-se à detecção das duas substâncias. Analisou-se 62,5% das amostras coletadas em Oeiras e Uruçuí, detectando-se presença de glifosato ou ácido aminometilfosfônico em 64% delas. Ao desagregar por município, comprovou-se contaminação em 46,1% e 83,4% das amostras analisadas provenientes de Oeiras e Uruçuí, respectivamente. Conclui-se que foi alta a contaminação do leite materno pelo agrotóxico glifosato, comprovando-se sua gravidade e importância enquanto fator de risco à saúde da mulher e da criança.

Palavras-Chave: Leite Materno, Contaminação, Agrotóxico, Herbicida.

LIMA, I. P. **Evaluation of the contamination of maternal milk by glyphosate agrototoxic in puerperas attended at public maternity hospitals in Piauí.** 2017, 66p. Master Thesis. Post-Graduation Program in Women's Health – CCS/UFPI.

ABSTRACT

Glyphosate is a herbicide with the greatest potential risk to human health because it is the most commercialized in the world, in Brazil and in State of Piauí. Based on this reality, this study aimed to evaluate the contamination of maternal milk by glyphosate agrototoxic in puerperas attended at public maternity hospitals in Piauí. We adopted a descriptive correlational study of cross-sectional applied in the municipalities of Teresina with 164 participants, Oeiras with 27 and Uruçuí with 13 participants. We developed a method of laboratory analysis of the samples of breast milk applied to the technique of high-performance liquid chromatography coupled photodiode detector array, through the derivatization reaction of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid by 9-fluorenylmethyl chloroformate. After experimental tests the chosen method for the analysis of the samples of breast milk was the isocratic gradient using the acetonitrile solvent to 10%. It was tested in triplicate and when passing through the detector we verified the presence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in chromatographic peaks in the range of 263 nanometers (nm), with correlation coefficient (r) equal to 0.9993, which led to the construction of the calibration curve and confirmation of its efficiency and linearity. Analysis of breast milk samples was limited to the detection of both substances. A total of 62.5% of the samples collected in Oeiras and Uruçuí were analyzed, where we detected presence of glyphosate or aminomethylphosphonic acid in 64% of them. When disaggregating by municipality, contamination was verified in 46.1% and 83.4% of samples analyzed from Oeiras and Uruçuí, respectively. We concluded this study showing the high contamination of the breast milk by glyphosate agrototoxic, proving its severity and importance as a risk factor for the woman's health.

Keywords: Breast Milk, Contamination, Agrototoxic, Herbicides.

“Primeiro o agrotóxico vai para os alimentos. Ele vai para a planta e depois ele vai sair para os grãos. Uma parte vai para a água, atinge o lençol freático e depois sai na água que a gente está bebendo. Uma parte evapora, vai para o ar e atinge quilômetros de distância. Outra parte, inclusive, condensa na chuva, vai para outros animais, quer dizer, contamina o solo. Nos humanos, vai para o sangue e a urina, vai para o tecido gorduroso”.

Médico e Professor Wanderley Pinhatti

LISTA DE SIGLAS

ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
ACS	Agente Comunitário de Saúde
ADAPI	Agência de Defesa Agropecuária do Piauí
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
AMPA-FMOC	Ácido aminometilfosfônico e Cloroformato de 9-fluorenilmetila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Fotodiodo
CV	Coefficiente de Variação
DCM	Diclorometano
DL	Dose Letal
DNV	Declaração de Nascidos Vivos
DP	Desvio Padrão
ESF	Equipe de Saúde da Família
FMOC	Cloroformato de 9-fluorenilmetila
FMOC-Cl	Cloreto de fluoronilmetiloxicarbonilo
FMS	Fundação Municipal de Saúde de Teresina
HRDA	Hospital Regional Dirceu Arcoverde
HRDC	Hospital Regional Deolindo Couto
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IA	Ingrediente Ativo
IARC	International Agency For Research On Cancer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LAGO	Laboratório de Geoquímica Orgânica
LM	Leite Materno
MDER	Maternidade Dona Evangelina Rosa
NA	Não Analisado
ND	Não Detectado

NV	Nascido Vivo
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan Americana da Saúde
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
POP	Poluente Orgânico Persistente
SESAPI	Secretaria Estadual de Saúde do Piauí
SINASC	Sistema de Informação de Nascidos Vivos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise estatística dos resultados das curvas analíticas do complexo FMOC	40
Tabela 2 -	Dados da linearidade por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector com arranjo de fotodiodo.	41
Tabela 3 -	Amostras de leite materno derivatizadas e analisadas para detecção de glifosato-FMOC e AMPA-FMOC relativas aos estabelecimentos de Oeiras e Uruçuí, Piauí.	43
Tabela 4 -	Frequência absoluta e relativa dos dados sociodemográficos e econômicos de puérperas participantes do estudo nos municípios de Oeiras e Uruçuí, Piauí.	49

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Classificação de agrotóxicos segundo concentração de toxicidade letal para o ser humano. 22
- Quadro 2** - Ingredientes Ativos (IA) comercializados no Brasil, Nordeste e Piauí, 2009 a 2013. 23

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fórmula estrutural do glifosato. 23
- Figura 2** - Cromatograma obtido da análise das soluções padrão do glifosato e AMPA (1mg.mL^{-1}), método exploratório de detecção 263 nm. 36
- Figura 3** - Cromatograma obtido da análise das soluções padrão de FMOC em (1mg.mL^{-1}), método exploratório de detecção 263 nm. 37
- Figura 4** - Reação química entre o glifosato e FMOC, com formação do complexo Glifosato-FMOC, com indicação de cromóforo. 38
- Figura 5** - Cromatograma do produto obtido da fração aquosa da reação de derivatização. 39
- Figura 6** - Curva de calibração do padrão FMOC-Cl obtido com *Clean Up* da fração aquosa da reação de derivatização do glifosato através das análises em triplicatas das seis concentrações. 40
- Figura 7** Cromatogramas do Glifosato-FMOC (A) e AMPA-FMOC (B) da fração aquosa da reação de derivatização. 42
- Figura 8** Cromatogramas das amostras de leite materno coletadas nos hospitais Deolindo Couto (Oeiras-Pi) e Dirceu Arcoverde (Uruçuí-Pi) derivatizadas com FMOC e a indicação de pico cromatográfico referente ao glifosato. 44
- Figura 9** Cromatogramas das amostras de leite materno coletadas nos hospitais Deolindo Couto (Oeiras-Pi) e Dirceu Arcoverde (Uruçuí-Pi) derivatizadas com FMOC e a indicação de pico cromatográfico referente ao AMPA. 45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	20
2.1	GERAL	20
2.2	ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	AGROTÓXICOS E SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA A SAÚDE HUMANA....	21
3.2	O GLIFOSATO ENQUANTO AGROTÓXICO DE MAIOR RISCO POTENCIAL PARA A SAÚDE HUMANA	23
4	MATERIAL E MÉTODO	25
4.1	DESENHO DE ESTUDO	25
4.2	LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO	25
4.3	POPULAÇÃO E AMOSTRA	26
4.4	INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS	27
4.4.1	Instrumentos de Coleta de Dados.....	27
4.4.2	Recipiente de Acondicionamento das Amostras de Leite	27
4.4.3	Procedimentos de Coleta, Acondicionamento e Transporte das Amostras	27
4.5	OPERACIONALIZAÇÃO DO ESTUDO	28
4.5.1	Desenvolvimento do Método de Análise Laboratorial	28
4.5.1.1	Material, Equipamentos, Reagentes, Amostras e Procedimentos	29
4.5.1.1.1	Material, Reagentes e amostras	29
4.5.1.1.2	Equipamentos	29
4.5.1.1.3	Procedimentos Experimentais / Obtenção das soluções tampões / Tampão borato pH 9,0 100 mM.....	30
4.5.1.1.4	Preparo do glifosato, ácido aminometilfosfônico (AMPA) e cloroformato de 9- flurenilmética (FMOC)	30
4.5.1.1.5	Reação de Derivatização utilizando soluções padrões de glifosato e cloroformato de 9-fluorenilmetila (FMOC)	31
4.5.1.1.6	Extração em Fase Sólida.....	31
4.5.1.1.7	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de radiação ultravioleta com arranjo de fotodiodos	31
4.5.1.1.8	Construção da curva de calibração	32
4.6	PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DOS DADOS	33

4.7	ASPÉCTOS ÉTICOS E LEGAIS.....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE GLIFOSATO, AMPA e FMOC	35
5.2	CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DAS PARTICIPANTES E FILHOS.....	48
6	CONCLUSÃO.....	54
7	PERSPECTIVAS.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	APÊNDICES	62
	APÊNDICE A TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	62
	APÊNDICE B TERMO DE ASSENTIMENTO.....	63
	APÊNDICE C DADOS SÓCIODEMOGRÁFICOS E ECONÔMICOS DA PARTICIPANTE	64
	APÊNDICE D DADOS DA CRIANÇA.	66

1 INTRODUÇÃO

O acelerado crescimento econômico brasileiro na área de agricultura traz consigo o uso em larga escala de agrotóxicos para preservar os plantios contra a ação danosa de seres vivos animais e vegetais, a ponto de titular o Brasil como o país maior consumidor mundial desses produtos (ABRASCO, 2015; BRASIL, 2012; LONDRES, 2011; PALMA, 2011). Mesmo sendo a agricultura o maior campo de aplicação, outras atividades são também consumidoras de agrotóxicos como a agropecuária, a produção industrial, as madeireiras, a silvicultura, o manejo florestal, a preservação de estradas, a saúde pública, o controle de algas, a desinsetização e a desratização.

Recente relatório divulgado pelo Ministério da Saúde sobre Populações Expostas a Agrotóxicos (BRASIL, 2016), numa série histórica de sete anos demonstra tendência de crescimento do binômio consumo de agrotóxico e área de cultivo agrícola. Em 2007 o consumo de agrotóxico em quilograma (kg) por hectare (ha) plantada foi de 10,32 kg/ha, elevando-se para 16,44 kg/ha no ano de 2013.

Ao correlacionar consumo de agrotóxicos com a população residente dos dois anos referidos, constatou-se que o consumo per capita de agrotóxico (kg) por habitante (hab) ano dobrou em sete anos, passando de 3,49 em 2007 para 6,09 kg/hab/ano em 2013, e como impacto na saúde o Brasil notificou neste último ano 12.534 casos de intoxicação por agrotóxicos, com incidência de 6,23 casos por cem mil habitantes, admitindo-se ainda possível de subnotificação, vez que para cada caso notificado 50 deixam de ser notificados (ABRASCO, 2015). Tal incidência assemelha-se às de outras doenças notificadas no mesmo ano em outras unidades da federação, como os casos de meningite notificados na região Nordeste que apresentou incidência de 6,4 casos por cem mil habitantes, e a hepatite no Piauí que atingiu incidência de 5,6 casos por cem mil habitantes (BRASIL, 2017).

Dentre os estados mais comercializadores de agrotóxicos no ano de 2013 consta o Piauí na décima quarta posição no *ranking* nacional com 10.126.913 kg comercializados, com média consumida de 6,73 kg/ha (BRASIL, 2016). Com base nos produtos vendidos e a população residente neste mesmo ano, obteve-se relação de consumo per capita de 3,18 kg/hab/ano.

No que se refere às competências para registro e regulação de Ingrediente Ativo (IA) presentes nos agrotóxicos, os ministérios da saúde, do meio ambiente e da agricultura assumem distintas responsabilidades inerentes a cada missão institucional (BRASIL, 2002). O Brasil registra mais de 400 IA e 2.700

formulações de agrotóxicos agrupados em categorias segundo nível de toxicidade e de acordo com suas monografias (ABRASCO, 2015).

No Estado do Piauí o registro de comercialização de agrotóxicos é de responsabilidade da Agência de Defesa Agropecuária (ADAPI), e o controle de cadastro é feito por município e pelo nome comercial do produto. De acordo com o banco de dados desta instituição no ano de 2014 foram cadastrados 623 produtos, destes só com o nome glifosato foram cadastradas 11 formulações (PIAUI, 2014).

No contexto dos agrotóxicos o glifosato tem liderado o mercado mundial da categoria de herbicidas com 60% das vendas de todos os ingredientes ativos (IAs) (AMARANTE JUNIOR *et al*, 2002; SOUZA *et al*, 2006). Tal liderança se confirma também no mercado brasileiro onde este produto responde por 33,6% dos agrotóxicos comercializados (BRASIL, 2016).

No Piauí, segundo dados divulgados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a comercialização do glifosato nos últimos anos tem representado cerca da metade de todos os agrotóxicos (BRASIL, 2015).

Em meio ao cenário agrícola de crescente consumo de agrotóxico, encontra-se a população trabalhando, consumindo, vivendo ou em circulação no entorno de áreas de manejo desses produtos. Tal situação configura exposição humana a agrotóxico, podendo implicar variados efeitos danosos e sistêmicos à saúde, sendo um deles o sistema endócrino, podendo atingir o organismo pelas vias dérmica, respiratória e oral (BRASIL, 2012).

Uma vez instalado no sistema endócrino em período gestacional ou puerperal, o agrotóxico pode causar múltiplas consequências à saúde da mulher, assim como para a criança amamentada, vez que é excretado também pelo leite materno (PALMA, 2011).

Segundo relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010), as complicações decorrentes de exposição a agrotóxicos para a saúde humana compreendem: alergias; distúrbios gastrintestinais, respiratórios, endócrinos, reprodutivos, neurológicos, neoplasias, suicídios e mortes acidentais, tendo como grupos de maior vulnerabilidade os trabalhadores, crianças, gestantes, lactentes, idosos e pessoas com problemas de saúde, cujas manifestações podem ocorrer de forma aguda ou crônica (BRASIL, 2012).

Diversas pesquisas têm sido realizadas sobre complicações por agrotóxicos relacionadas à saúde da mulher. Palma (2011) analisou dez substâncias em amostras de leite materno de 62 puérperas residentes no município de Lucas do Rio Verde-MT, todas contaminadas por agrotóxicos e 85% delas foram constatadas mais de uma substância tóxica.

Pesquisas internacionais têm priorizado os efeitos de pesticidas organoclorados na saúde humana decorrente no tratado de Estocolmo realizado em 1991, onde 92 países se comprometeram a eliminar ou reduzir a circulação de dez substâncias químicas consideradas poluentes orgânicos persistentes (POP), por serem considerados de lenta degradação na natureza (BRASIL, 2015a).

Este estudo destaca algumas pesquisas internacionais sobre presença de Pop em leite humano: Bergkvist *et al.* (2012) coletaram no ano de 2011 e analisaram 72 amostras de leite de puérperas residentes na zona rural de Matlab, Bangladesh; Fujii *et al.* (2012) coletaram no período de 2007 a 2009 e analisaram 70 amostras de leite de puérperas provenientes da China, Coréia e Japão; Croes *et al.* (2012) coletaram nos anos de 2009-2010 e analisaram 84 amostras de leite de puérperas residentes na zona rural de Flanders, Bélgica; Song *et al.* (2013) coletaram no período de 2009 a 2011 e analisaram 48 amostras de leite de puérperas residentes Pequim; Mannetje *et al.* (2013) coletaram no período de 2007-2010 e analisaram 39 amostras de leite de puérperas residentes nas zonas rural e urbana de Nova Zelândia; Bedi *et al.* (2013) coletaram nos meses de novembro e dezembro de 2011 e analisaram 53 amostras de leite de puérperas que realizaram parto em uma maternidade de Punjab, Índia; Rojas-Squella *et al.* (2013) coletaram e analisaram 32 amostras de leite de puérperas participantes de Programas de amamentação e crescimento no Hospital Fontibón em Bogotá, Colômbia. Em todos estes estudos foi constatada presença de uma ou mais substância tóxica, em níveis acima dos estabelecidos.

Embora evidências científicas de contaminação do leite materno por agrotóxicos, a importância do aleitamento materno à criança permanece preservada, sendo recomendado como alimentação exclusiva nos primeiros meses de vida por favorecer o bom desenvolvimento do estado nutricional, a prevenção de diversas doenças e a redução mortalidade infantil (BRASIL, 2015b).

O processo de produção de leite materno tem três fases: a primeira denominada lactogênese I que inicia na gravidez quando a mama começa a ser preparada sob ação de diversos hormônios; a lactogênese fase II acontece a partir do nascimento da criança até o quarto dia do pós-parto e se caracteriza pela descida do leite dos alvéolos para o mamilo. A última fase é denominada galactopoiese que compreende todo período de lactação. O leite produzido nos primeiros dias é denominado colostro, rico em proteínas e menos gorduroso que o leite normal que é formado a partir do sétimo dia (BRASIL, 2015b; PORTUGAL, 2012).

A anatomia da mama é formada por gordura e tecidos de sustentação que envolve os alvéolos em quantidade variada que reflete no tamanho do seio de cada mulher, embora a produção de leite independa da quantidade de tecido glandular. A mulher ao amamentar provoca o surgimento de estímulos sensoriais que vão do mamilo ao cérebro, este através da hipófise segrega prolactina que circula através do sangue para a mama fazendo as células secretoras dos alvéolos produzir leite (PORTUGAL, 2012). O tecido gorduroso pode servir de repositório dos agrotóxicos instalados no organismo da mulher e ao circular pelas veias sanguíneas pode comprometer os eritrócitos, causar lise na membrana placentária e comprometer o feto (BATISTA, 2006; RODRIGUES, 2009; PALMA, 2011).

A composição da mama com tecido gorduroso, a receptividade deste à acumulação de agrotóxicos pela via sanguínea por onde também circula a prolactina que comanda a produção de leite pelos alvéolos, evidencia a possibilidade do leite materno ser contaminado por estas substâncias tóxicas, vez que estas podem ser excretadas do organismo humano pelo leite materno (PALMA, 2011, PORTUGAL, 2012).

Em termos de intervenções pelo poder público de saúde, poucas iniciativas têm sido efetivadas, quer de promoção, quer de cuidado à saúde da população frente a este fator de risco, às doenças dele decorrentes e/ou à morte (BRASIL, 2012). A Secretaria estadual de saúde do Piauí tencionou monitorar a presença de agrotóxicos em leite materno (PIAUI, 2013), porém sem concretização por questões estruturais para a oferta deste serviço, ausência de metodologia de análise e de laboratório, fato que estimulou a realização deste estudo.

Como vertente de estudo, optou-se avaliar a contaminação do leite materno pelo produto de maior comercialização no Estado do Piauí que é o herbicida glifosato e seus sais derivados, tanto pela relação direta maior oferta, maior o risco de exposição da população, como pelo potencial deletério à saúde da população, podendo causar várias doenças, inclusive o câncer (BATISTA, 2006; BRASIL, 2015c; IARC, 2015).

Para conhecer a dimensão deste fator de risco na saúde da mulher, avaliou-se a contaminação do leite materno pelo agrotóxico glifosato em puérperas atendidas em estabelecimentos públicos do Piauí, expressando por meio dos achados as respostas para as seguintes perguntas de pesquisa: “existe contaminação do leite materno pelo agrotóxico glifosato?”, e “sendo confirmada a contaminação do leite materno por esta substância, como se comporta sua distribuição?”. Para encontrar os elementos de respostas, necessitou-se desenvolver um método analítico laboratorial compatível com a técnica de separação de misturas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) existente no laboratório de

geoquímica orgânica (LAGO) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), em colaboração com pesquisadores deste laboratório mencionados nos agradecimentos.

A CLAE é uma das técnicas de cromatografia líquidas mais usadas em laboratório para a separação de misturas presentes em uma amostra pela capacidade de separar, identificar e quantificar compostos químicos de forma rápida, eficiente e com resolução sob alta pressão (COLLINS, 1997). Esta técnica é constituída pelos seguintes elementos críticos: a coluna que proporciona a separação dos compostos químicos por interação das substâncias com a fase sólida que preenche a coluna também conhecida como fase estacionária; o eluente, mistura de solventes que interage com o analito de interesse e arrastá-lo através da fase móvel com o fluxo de eluição constante a fim de garantir a reprodutibilidade do método de análise.

O estudo demonstrou a dimensão da contaminação do leite materno pelo agrotóxico glifosato em municípios do Piauí, podendo servir de instrumento para a tomada de decisões pela gestão do sistema de saúde, tanto na aplicação do método de análise desenvolvido na rotina do serviço de saúde, como para a vigilância e atenção à saúde da mulher e da criança exposta a este fator de risco.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a contaminação de leite materno pelo agrotóxico glifosato em puérperas atendidas em maternidades públicas do Piauí.

2.2 ESPECÍFICOS

Caracterizar as participantes da pesquisa quanto aos aspectos sociodemográficos e econômicos;

Desenvolver método de detecção e quantificação do agrotóxico estudado nas amostras de leite materno, e

Quantificar o agrotóxico glifosato no leite de puérperas atendidas em maternidades públicas de saúde do Piauí.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AGROTÓXICOS E SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA A SAÚDE HUMANA

Os agrotóxicos enquanto substâncias tóxicas aplicadas no meio ambiente têm se tornado importante fator de risco à saúde humana (ABRASCO, 2015; BRASIL, 2015c; LONDRES, 2011; PALMA, 2011), e como o meio ambiente é o espaço onde as pessoas vivem e trabalham, além de fator de risco se constituem também como um dos determinantes sociais em saúde (BUSS e PELLEGRINI FILHO, 2007; MENDES, 2011).

O consumo de agrotóxico no Brasil teve sua expansão apoiada no processo de desenvolvimento econômico a partir dos anos 70 (BRASIL, 2010; LONDRES, 2011; PALMA, 2011), mantendo-se em tendência crescente com predomínio na agricultura, sendo consumido também em outras atividades como na saúde pública, em uso veterinário, dentre outros (ABRASCO, 2015; BRASIL, 2012).

No campo da saúde pública, a metodologia orientada pelo Ministério da Saúde para combate aos mosquitos transmissores das doenças vem sendo criticada por ser considerada ineficiente, ultrapassada e de risco para adoecimento da população, em especial às gestantes e uma das hipóteses de fatores causadores da recente epidemia de microcefalia em crianças (ABRASCO, 2016).

O marco regulatório brasileiro relacionado a agrotóxico encontra-se apoiado na Lei 7.802 (BRASIL, 1989), regulamentada pelo Decreto federal nº 4.074 (BRASIL, 2002) e dentre as definições de responsabilidades institucionais, compete ao Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a responsabilidade pela classificação dos agrotóxicos segundo concentração de toxicidade em dose letal (DL) para o ser humano estabelecido pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), conforme Quadro 1:

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO DE AGROTÓXICOS SEGUNDO CONCENTRAÇÃO DE TOXICIDADE LETAL PARA O SER HUMANO.

CLASSE	GRUPO	DL ₅₀ (mg/kg de peso vivo)	Dose capaz de matar uma pessoa adulta	Cor do rótulo do produto
I	Extremamente tóxico	< 50	1 pitada - algumas gotas	Vermelho
II	Altamente tóxico	50 – 500	Algumas gotas - 1 colher de chá	Amarelo
III	Moderadamente tóxico	500 – 5000	1 colher de chá – 2 colheres de sopa	Azul
IV	Pouco tóxico	5000 ou +	2 colheres de sopa - 1 copo	Verde

FONTE: OPAS (1996)

Considera-se dose letal a concentração de substância capaz de matar uma pessoa adulta (OPAS, 1996). Tal entendimento é criticado em estudo mais recente sobre a concepção de dose letal como faixa de segurança para humanos, por considerar que uma pessoa ao ingerir agrotóxico até o limite de DL estabelecido em cada classe/grupo pode não morrer de forma súbita, mas evoluir de forma gradativa já que todos os agrotóxicos causam dano à saúde humana independente da classificação toxicológica (ABRASCO, 2015).

Os agrotóxicos são classificados também quanto a grupo químico em: organofosforado, organoclorado, carbamato, piretróide, triazina, e outros (BRASIL, 1989). Tal classificação serve de base para direcionamento de condutas de cuidado a pessoas acometidas de intoxicação. Quanto à finalidade de combate às pragas, os agrotóxicos se classificam em praguicida, fungicida, herbicida, raticida, acaricida, molusquicida, nematocida e fundante (OPAS, 1996; ABRASCO, 2015).

Quanto aos efeitos sobre a saúde humana, os agrotóxicos podem causar doenças e mortes na população, podendo estas se manifestar de forma aguda e/ou crônica. Por sua vez, tanto os profissionais como os serviços de saúde carecem de preparo para a detecção e manejo adequados, implicando em importante subnotificação de casos, com estimativa de para cada caso notificado, 50 deixam de ser notificados, mascarando seu real impacto na saúde humana (ABRASCO, 2015; BRASIL, 2012; PALMA, 2011). Entre os efeitos destacam-se: infertilidade, impotência, abortos, malformações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, efeitos sobre o sistema imunológico e câncer (BRASIL, 2015c).

3.2 O GLIFOSATO ENQUANTO AGROTÓXICO DE MAIOR FATOR DE RISCO POTENCIAL PARA A SAÚDE HUMANA

O glifosato é o agrotóxico mais vendido no mundo, no Brasil e no Piauí, sendo produzido em variadas formulações e registrado em mais de cem países (LONDRES, 2011; RODRIGUES, 2009) e no Brasil é registrado para uso em 26 culturas distintas (BRASIL, 2010). De acordo com o índice monográfico é classificado em classe toxicológica IV, grupo químico glicina substituída e classe/ação herbicida, podendo ainda ter em sua formulação três tipos de sais: glifosato - sal de isopropilamina (glyphosate-isopropylammonium) de classificação toxicológica IV, Glifosato - sal de potássio (glyphosate-potassium) de classificação toxicológica III, e o Glifosato - sal de amônio (glyphosate-ammonium) de classificação toxicológica IV. É identificado pela fórmula bruta $C_3H_8NO_5P$ e fórmula estrutural mostrado na Figura 1.

De acordo com dados disponibilizados pelo IBAMA (BRASIL, 2015), de todos os IAs o glifosato lidera a comercialização no Brasil, na região Nordeste e no Piauí, conforme demonstrado na, conforme Quadro 2.

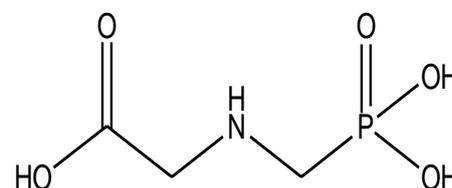


FIGURA 1. FÓRMULA ESTRUTURAL DO GLIFOSATO (BRASIL, 2015d)

QUADRO 2 - INGREDIENTES ATIVOS (IA) COMERCIALIZADOS, BRASIL, NORDESTE E PIAUÍ, 2009 A 2013

ABRANGÊNCIA	RESULTADO DE COMERCIALIZAÇÃO (em tonelada)	ANO DE COMERCIALIZAÇÃO				
		2009	2010	2011	2012	2013
BRASIL	Total de IA	300.349,70	384.501,28	422.242,26	477.792,44	495.764,55
	Glifosato	118.484,57	134.117,29	131.898,00	187.777,18	184.967,70
	Percentual de Glifosato comercializado	39,45	34,88	31,24	39,30	37,31
NORDESTE	Total de IA	15.537,11	27.883,84	33.097,97	38.270,14	39.990,27
	Glifosato	6.498,45	11.811,84	14.515,53	9.020,99	16.890,28
	Percentual de Glifosato comercializado	41,83	42,36	43,86	23,57	42,24
PIAUI	Total de IA	1.291,12	2.454,66	3.332,24	4.372,46	4.358,78
	Glifosato	736,33	1.443,46	1.954,69	2.616,02	2.179,91
	Percentual de Glifosato comercializado	57,03	58,80	58,66	59,83	50,01

FONTE: O Autor (2017), adaptado de BRASIL (2015).

Os agrotóxicos, mesmo aqueles pertencentes à classe IV de baixa toxicidade como é o caso do glifosato, pode provocar lise na membrana celular, comprometer o metabolismo e os eritrócitos humanos e causar efeitos danosos à saúde humana de forma tanto aguda, como crônica, incluindo aborto (BATISTA, 2006; RODRIGUES, 2009).

No organismo da mulher a mama se constitui um local receptivo à acumulação de agrotóxico a partir da formação anatômica constituída por tecido gorduroso (BRASIL, 2015b; PORTUGAL, 2012). Uma vez instalado e em combinação com a formação do leite materno na fase gravidez/puerpério, constitui-se em risco tanto para a saúde da mulher, como da criança em fase de amamentação (PALMA, 2011; ABRASCO, 2015). Dessa realidade, o Brasil e o Mundo têm desenvolvido estudos voltados para a presença de agrotóxicos em leite materno (PALMA, 2011; BERGKUIST et. al., 2013; CROES et. al., 2012; FUGII et. al., 2012; BEDI et. al., 2013; MANNETJE et al., 2013; ROJAS-SQUELLA et. al., 2013; SONG et. al., 2013).

Para a realização deste estudo, compatibilizou-se a estrutura laboratorial existente na UFPI com as técnicas de separação e identificação de compostos químicos existentes, decidindo-se pela Técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), (COLLINS, 1997).

O glifosato e seu principal metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) por ser constituído de estrutura química iônica, é incapaz de absorver radiação ultravioleta em comprimento de 290 nanômetros (nm) necessário para ser detectado em CLAE, sendo necessário desenvolver um método de análise cromatográfica através de reação de derivatização com o uso do composto químico cloroformato de 9-fluorenilmetila (FMOC) (KHROLENKO e WIECZOREK, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um desenho de estudo correlacional descritivo e de corte transversal para avaliar a presença e os limites de quantificação da contaminação do leite materno de puérperas residentes no Piauí pelo agrotóxico glifosato.

O estudo correlacional descritivo se caracteriza por descrever variáveis e as correlações que ocorrem entre elas (SOUSA, V.; DRIESSNACK, M.; MENDES I, 2007). É também considerado de corte transversal por investigar a situação de saúde de uma população a partir de avaliação individual que, uma vez agregados, permite a produção de indicadores globais (ALMEIDA FILHO, 2003). Caracteriza-se ainda pela instantaneidade ou curto tempo de aplicação.

4.2 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido na população de puérperas residentes no Estado do Piauí que se encontravam amamentando no período de 28 de novembro de 2016 a 13 de fevereiro de 2017 que realizaram partos em um dos seguintes estabelecimentos de saúde: Maternidade Dona Evangelina Rosa (MDER) situada em Teresina; Hospital Regional Deolindo Couto (HRDC) situado na cidade de Oeiras, e Hospital Regional Dirceu Arcoverde (HRDA) situado na cidade de Uruçuí.

A opção por estes locais de estudo foi baseada em um plano estadual de vigilância de populações expostas a agrotóxico elaborado pela SESAPI (PIAUI, 2013), onde os municípios prioritários foram definidos com base em áreas de cultivo agrícolas, agregados por territórios de desenvolvimento (PIAUI, 2007). Por este plano o município de Uruçuí enquanto sede do território de desenvolvimento Alto Parnaíba foi a região com maior área de cultivo agrícola, enquanto o município Oeiras sede do território de desenvolvimento Vale do Rio Canindé foi a região com menor área de cultivo agrícola. Dessa realidade resolveu-se desenvolver esta pesquisa nas maternidades situadas nos dois extremos de áreas de cultivo agrícola do Piauí, incluindo-se ainda a MDER por ser a única maternidade de referência do Piauí para procedimentos de alto risco gravídico-puerperal.

4.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população do estudo foi constituída por puérperas residentes no Estado do Piauí que se encontrava em período de amamentação. Para efeito deste estudo, considerou-se puérpera a mulher em fase de pós-parto, incluindo-se puerpério remoto (REZENDE, 2005). Adotou-se para a definição da população a quantidade de partos com Nascidos Vivos (NV) captados pelo sistema de informação de nascidos vivos (SINASC) no ano anterior a esta pesquisa (2014) que registrou 11.222 partos com NV nos três estabelecimentos, com a seguinte distribuição:

- Maternidade Dona Evangelina Rosa em Teresina com 9.770 partos de gravidez única, 184 de gravidez dupla, 4 de gravidez tripla e 178 sem informação sobre o tipo de gravidez, totalizando 10.136 partos;
- Hospital regional Deolindo Couto de Oeiras com 779 partos de gravidez única, 5 de gravidez dupla e 6 sem informação sobre o tipo de gravidez, totalizando 790 partos;
- Hospital regional senador Dirceu Mendes Arcoverde de Uruçuí com 294 partos de gravidez única e 2 partos de gravidez dupla 296 puérperas com partos.

Com relação ao tamanho da amostra, na ausência de estudos locais sobre contaminação de leite materno por agrotóxico e supondo-se uma amostra aleatória simples, adotou-se a fórmula (ARANGO, 2009):

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{E^2}$$

onde: Z (1,96) é o valor crítico associado ao nível de confiança adotado de 95%; p corresponde à proporção de ocorrência para valores amostrais desconhecidos (50%), q é a proporção de não ocorrência (1-p) e E corresponde ao erro máximo amostral (0,05), obteve-se uma amostra (n) de 384 puérperas. A amostra foi estratificada proporcionalmente ao número de puérperas com partos nos três estabelecimentos de saúde, resultando na seguinte distribuição: Maternidade Dona Evangelina Rosa com 347 puérperas; hospital regional Deolindo Couto de Oeiras com 27 puérperas, e hospital regional Dirceu Arcoverde de Uruçuí com 10 puérperas.

Das amostras estimadas, foram pesquisadas 164 em Teresina (47,4%), 27 em Oeiras (100%) e 13 em Uruçuí (118,2%). A meta deste último município foi extrapolada para atender forte adesão e apelo dos ACS colaboradores em assegurar puérperas de suas áreas na pesquisa.

Foi considerado como critério de inclusão, puérperas em fase de amamentação e residentes em qualquer município do Piauí que realizaram parto em um dos três estabelecimentos de saúde definidos neste estudo, e como critério de exclusão puérperas que embora tenham realizado partos em um dos três estabelecimentos de saúde residiam em outro estado da federação.

4.4 INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS

4.4.1 Instrumentos de coleta de dados

Foram utilizadas três fontes de dados primários: a primeira fonte foi constituída por dados constantes nos questionários aplicados puérpera participante apêndice C; a segunda fonte contendo dados relacionados à criança apêndice D, e a terceira fonte foram os resultados dos exames laboratoriais das amostras de leite materno. Cada instrumento recebeu numeração sequencial, agregada por estabelecimento do parto da participante, obedecendo a seguinte sequência:

- 1/de 1 a 164 para as puérperas vinculadas à MDER;
- 2/de 1 a 27 para as puérperas vinculadas ao HRDC, e
- 3/de 1 a 13 para as puérperas vinculadas ao HRDA.

4.4.2 Recipiente de acondicionamento das amostras de leite materno

O recipiente usado para armazenar as amostras de leite foi tubo de falcon, com tampa roscável, capacidade 15 mL. Cada amostra coletada foi identificada com a mesma numeração constante nos formulários de coleta dos dados, assegurando-se a fiel identificação numérica entre as informações obtidas nos formulários de coleta dos dados com a amostra do leite doado por cada puérpera.

4.4.3 Procedimentos de coleta, acondicionamento e transporte das amostras

Todas as puérperas internadas no ato das visitas foram convidadas, observando-se os critérios de inclusão e exclusão. Aquelas que aceitaram participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido ou termo de assentimento, seguido do

preenchimento dos formulários relacionados à mãe e à criança. Em seguida foi entregue um copo descartável para facilitar a extração do leite que ia sendo imediatamente em recipiente e temperatura apropriados.

Durante a realização dos trabalhos desta etapa nos três estabelecimentos, deparou-se com a falta de produção de leite pela maioria das puérperas, decorrente do recente nascimento da criança. Tal situação necessitou mudança de estratégia e a extensão complementar do trabalho para o domicílio das puérperas que já tinham recebido alta a partir do início da pesquisa. Para isto, obteve-se os endereços das puérperas nos três estabelecimentos da pesquisa, agregou-se por bairro e buscou-se apoio das equipes de saúde da família (ESF).

Algumas puérperas que concordaram participar da pesquisa apresentaram dificuldade de extração do leite. Aquelas que se encontravam na MDER foram orientadas por nutricionistas do banco de leite da instituição, e aquelas que se encontravam nos domicílios foram auxiliadas pelas Agentes Comunitárias de Saúde (ACS) que orientavam sobre massagem das mamas. Ao final de cada dia as amostras coletadas foram armazenadas no freezer do banco de leite da MDER à temperatura interna de $-22,9^{\circ}$ C, tanto as amostras ali coletadas, como as coletas complementares realizadas nos domicílios das puérperas de Teresina.

Às sextas-feira todo material coletado durante a semana era transportado para o LAGO.

Nos demais estabelecimentos, por serem distantes do LAGO, o acondicionamento das amostras foi feito em cilindro de nitrogênio com temperatura interna de -196° C.

4.5 OPERACIONALIZAÇÃO DO ESTUDO

Como etapa anterior à coleta de dados, foi realizado o pré-teste para avaliar a compreensibilidade dos formulários, não sendo constatado dificuldade de compreensão ou preenchimento, prosseguindo-se com a pesquisa de campo com a coleta, processamento e análise dos dados sociodemográficos extraídos dos apêndices C e D, simultâneo ao desenvolvimento do método de análise laboratorial das amostras de leite materno das participantes da pesquisa.

4.5.1 – Desenvolvimento do Método de Análise Laboratorial

Para desenvolver o método de detecção do glifosato nas amostras de leite materno, utilizou-se da estrutura de equipamentos existentes no LAGO e adquiriu-se os padrões Glifosato, ácido aminometilfosfônico (AMPA) e cloroformato de 9-fluorenilmetila (FMOC) para os procedimentos experimentais a seguir descritos:

4.5.1.1 Materiais, Equipamentos, Reagentes, Amostras e Procedimentos

4.5.1.1.1 Material, Reagentes e amostras

Para o desenvolvimento da etapa analítica de identificação e quantificação de agrotóxico e seu derivado foram utilizados os padrões grau HPLC Glifosato (97%); ácido aminometilfosfônico (AMPA, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ – 99%) e Cloroformato de 9-fluorenilmetila (Cloridrato de FMOC - $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClO}_2$, 99%), solventes metanol e acetonitrila grau HPLC que foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich[®]. Para o preparo das soluções tampão utilizou-se fosfato de sódio monobásico e dibásico anidros (ambos da Dinâmica[®], Brasil), ácido bórico e cloreto de potássio, ambos P.A (Synth[®], Brasil), e água ultrapurificada tipo 1. Para o preparo das amostras analisadas por cromatografia líquida foram utilizados cartuchos de fase reversa de 3 mL com 500 mg octadecil (C_{18} , Chromabond[®] - Macherey-Nagel. Para a etapa de *clean up* e extração em fase sólida), vials N9 11,6 x 32 mm com 1,5 mL com tampas screw septos PTFE/silicone (Uniglas[®]), seringas luer lock de 10 mL, filtros para seringa com membrana de nylon 0,2 μm e 13 mm de diâmetro (filtração das amostras e padrões analisados por cromatografia líquida) e 0,45 μm com 25 mm de diâmetro (filtração das soluções tampão) ambos da Phenomenex[®], Metanol P.A (Vetec[®]) Diclorometano P.A (Dinâmica[®], Brasil).

As amostras de análise por HPLC foram secas em balão de fundo redondo 125 mL com junta esmerilhada 24/40 (Per-Lab[®]) e as soluções padrão de análise foram utilizados balões volumétricos de vidro borosilicato classe A com rolha de polipropileno, volumes de 25 e 5 mL (Diogolab[®]).

4.5.1.1.2 Equipamentos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência foi utilizado equipamento HPLC da Shimadzu Proeminence[®] com detector de arranjo de fotodiodo (utilizando lâmpada de deutério), desgaseificador DGU-20A3 e duas bombas LC-20AD Shimadzu, injetor automático Shimadzu Sil-10 com loop de 20 uL e colunas C₁₈ Zorbax[®] SB-CN 5µm 100A 150 x 4,6mm da Agilent[®] e Kinetex[®] 5µm EVO C18 100A 250 x 4,6mm, 5,0 µm da Phenomenex[®].
- Pipeta automática Finnpiquette F1[®], volume de 100 – 1000 uL da Thermo Scientific[®].
- Evaporador rotativo 801 com banho de aquecimento modelo 550, bomba de vácuo tipo Diafragma modelo 826T todos fabricados pela Fisatom e sistema de resfriamento ultratermostático modelo LS541 da Logen[®].
- Agitador tipo Vortex LSM564/4, Logen[®] com agitação de até 2800rpm.
- Centrifuga refrigerada SL – 701 SOLAB[®] 15 minutos de centrifugação a 5000 rpm com temperatura com set point de 15 °C.
- Cuba Ultrasônica de 50-60 Hz com capacidade para 2,5 L e Frequência ultrasônica de 45 kHz
- Agitador magnético com aquecimento modelo 752A - Fisatom[®]
- Sistema de produção água ultra pura - Master System MS 2000 da Gehaka[®].
- PHmetro digital de bancada PHS-3E com eletrodo universal para faixa de 0 – 14 pH – pHtek[®].
- Balança digital analítica da ATX224 da Shimadzu[®], medida máxima de 220 g, leitura de 0,1 mg, desvio padrão $\geq 0,1$ mg, linearidade $\pm 0,2$ mg.
- Agitador magnético modelo 752A da Fisatom[®]

4.5.1.1.3 Procedimentos Experimentais / Obtenção das soluções tampões / Tampão borato pH 9,0 100mM

O tampão borato (pH 9,0) foi preparado na concentração de 125 mM, ajustado com KOH 6 M quando necessário. O pH da solução final foi determinado com o pH digital (BRASIL, 2010a).

Para o preparo da solução tampão de fosfato, dissolveu-se 17,0 g de fosfato de potássio dibásico e adicionou-se 0,19 mg fosfato de potássio monobásico em água

ultrapurificada suficiente para 1000 mL em balão volumétrico e o pH de solução final foi determinado com o pH do digital e ajustou-se o pH com hidróxido de potássio 10 M, quando necessário (BRASIL, 2010a).

4.5.1.1.4 Preparo do glifosato, ácido aminometilfosfônico (AMPA) e cloroformato de 9-fluorenilmetila (FMOC).

O glifosato (97%); o ácido aminometilfosfônico (AMPA, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ – 99%) e o agente derivatizante cloroformato de 9-fluorenilmetila (Cloridrato de FMOC - $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClO}_2$, 99%) foram dissolvidos em acetonitrila grau HPLC sendo obtidas soluções padrões de 500 mg L^{-1} . Para as análises em HPLC as soluções foram diluídas para a concentração de 1 mg L^{-1} .

4.5.1.1.5 Reação de Derivatização utilizando soluções padrões de glifosato e cloroformato de 9-fluorenilmetila (FMOC).44

O método de derivatização do glifosato foi baseado e adaptado dos estudos de Olívio *et al.* (2015), Catrinck (2014) e Schrubbers (2016). A derivatização do glifosato e AMPA padrão 500 mg L^{-1}) iniciou com uma alíquota de 1,0 mL desta substância em um tubo de ensaio misturado com 500 μL de tampão borato (pH 9,0) e 300 μL de água Milli-Q, para 5,0 mL de FMOC-Cl. Após agitação em vórtex por 5 minutos a 2000 rpm, o complexo glifosato-FMOC foi extraído com 5 mL (x 3) de diclorometano (DCM) e centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos à temperatura de 20 °C. A fase Aquosa do complexo foi separada da fração diclorometânica através de funil de separação e seca com auxílio de evaporador rotativo. A Fração aquosa do complexo foi ressuspensa em solução com tampão fosfato e com concentração final de 1 mg.mL^{-1} . Foi encaminhada para análise por CLAE para verificar a eficiência da reação de derivatização (KHROLENKO & WIECZOREK, 2005; NEDELKHOSKA & LOW, 2004).

4.5.1.1.6 Extração em Fase Sólida

Após a avaliação inicial por cromatografia líquida do produto da reação de derivatização, a fração aquosa do glifosato derivatizado, o complexo Glifosato-FMOC foi submetido à etapa de *clean up*. Foram utilizados cartuchos de fase reversa de 3 mL com 500

mg octadecil (C_{18} Chromabond® Macherey-Nagel). O cartucho foi ativado com 12 mL de Metanol (MeOH), seguidos de 12 mL de tampão fosfato, sendo finalmente eluídos 12 mL de Tampão: MeOH. Após ativação 30 mg da amostra foram diluídos em 500 μ L, aplicados no cartucho e posteriormente eluídos com outros 12 mL do eluente (Tampão fosfato: MeOH - 9:1). O eluato foi filtrado em seringa no tamanho de 13 mm de comprimento com membrana filtrante de teflon e gramatura de 0,45 μ m. O material filtrado foi seco em evaporador rotativo e ressuspenso posteriormente em tampão fosfato e acetonitrila grau HPLC (9:1) obtendo-se uma solução de análise de 1 mg.mL⁻¹.

4.5.1.1.7 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de radiação ultravioleta com arranjo de fotodiodos.

Os padrões glifosato e FMOC, bem como o produto final da reação de derivatização, complexo glifosato-FMOC, foram todos analisados por CLAE acoplada a detector de Ultravioleta (UV) com arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD). As amostras dos padrões foram solubilizadas com acetonitrila grau CLAE, filtradas em filtro 0,22 μ m, obtendo-se uma solução padrão de 1 mg. mL⁻¹ para análise em Cromatógrafo líquido de alta eficiência da Shimadzu Proeminence®, sendo injetados 10 μ L da solução de análise em uma coluna C_{18} Zorbax SB-CN 5 μ m 100A 150 x 4,6mm. O método de análise inicial foi o gradiente exploratório com o seguinte sistema de solventes: A) tampão fosfato pH 10 a 100 mM e B) Acetonitrila eluídos em gradiente linear: 5% B mantido por 2 minutos, 100% B em 60 minutos, mantida a 100% B até completar 78 minutos de análise, com detecção em 263 nm. Após as análises iniciais o método foi otimizado após diversas injeções das amostras e padrões, sendo o método isocrático a 10% do solvente B e por 20 minutos o método escolhido para análise do complexo glifosato-FMOC após etapa de *clean up*, e para a construção da curva de calibração que foi utilizada para a identificação e quantificação de glifosato nas amostras de leite materno. Para a análise do AMPA o método escolhido também foi o método isocrático mas a 20% do solvente B e por 20 minutos e a coluna utilizada foi Kinetex 5 μ m EVO C_{18} 100A 250 x 4,6mm e tamanho de partícula de 5,0 μ m.

4.5.1.1.8 Construção da curva de calibração

Após a otimização do método de análise das amostras, o produto da derivatização do glifosato foi utilizado para a construção da curva de calibração com padrão externo para a quantificação do glifosato em leite materno.

Para a construção da curva de calibração, o produto da reação glifosato e FMOC foi submetido à etapa de *clean up* em tampão fosfato/acetonitrila na proporção de 9:1. Após a eluição a amostra foi seca em evaporador rotativo, ressuspensa com o solvente de eluição e filtrada em seringa de 10 mL com filtro de 15 mm com membrana de nylon com gramatura de 0,22 μm , perfazendo uma solução estoque A de 10 mg.L^{-1} . Uma segunda alíquota de 2,5 mL da solução estoque A foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com tampão fosfato a fim de obter a solução estoque B com a concentração de 1 mg.L^{-1} . Com auxílio de pipeta automática monocanal Finnpiquette F1, volume de 100 – 1000 μL , para obtenção das soluções de 90, 75, 60, 45, 30 e 10 mg.L^{-1} em triplicata com detecção dos picos cromatográficos em 263 nm.

A curva de calibração foi obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados entre as concentrações das soluções de análise e a área dos picos cromatográficos obtidos em cada análise.

4.6 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DOS DADOS

Os dados sociodemográficos das participantes e das crianças e os resultados das análises laboratoriais de leite materno foram digitados em planilha no Microsoft Excel versão 2010. Os resultados encontram-se apresentados em tabelas, à luz do referencial do estudo.

4.7 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

Este estudo foi submetido previamente ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal do Piauí, nos termos da Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012a), tendo sido aprovado em 22.12.2015, conforme Parecer nº 1.380.146.

As participantes foram esclarecidas sobre todos os aspectos e fases da pesquisa, principalmente sobre o objetivo, riscos e benefícios. Elas foram informadas e convidadas a participar de forma esclarecida, voluntária e gratuita e aquelas que aceitaram foi solicitada a

assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para puérperas maiores de 18 anos – Apêndice A, ou Termo de Assentimento que foi assinado por parente ou responsável por puérpera menor de idade ou reconhecida como incapaz – Apêndice B.

As participantes ou responsáveis assinaram os correspondentes termos em duas vias. Foram informadas sobre a natureza da pesquisa, sobre aspectos relacionados à destinação de cada amostra do leite doado que foi o laboratório geoquímica orgânica da UFPI e sobre os resultados das análises usadas exclusivamente no objeto da pesquisa. Foi enfatizado que a participação não era obrigatória, sendo que poderiam desistir a qualquer momento, bastando apenas retirar seu consentimento, que em caso de sua recusa não implicaria em nenhum prejuízo na sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Pela participação no estudo nenhum valor monetário foi recebido pelas participantes, mas tiveram a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não seriam de suas responsabilidades.

Ao concordar em participar do estudo, o nome e identidade da participante foram mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei ou por solicitação da envolvida, somente o pesquisador e a equipe do estudo, Comitê de Ética independente e inspetores de agências regulamentadoras do governo (quando necessário) teriam acesso aos dados da pesquisa para verificar as informações do estudo. Foi esclarecido à participante o acesso a quaisquer esclarecimentos sobre a pesquisa mediante os contatos (endereço, telefone e e-mail) do Coordenador e responsável pela pesquisa, que se encontram identificados tanto no TCLE, como no Termo de Assentimento. Seus dados foram utilizados somente para finalidade científica e o anonimato quanto à identidade foi resguardado.

As participantes desta pesquisa foram informadas quanto aos possíveis riscos e benefícios que poderiam ocorrer durante a realização da pesquisa. Quanto aos riscos o único desconforto aconteceu com poucas puérperas que por insuficiência de leite ou ser primípara, tiveram dificuldades durante a extração do leite. Quando isto aconteceu a mãe foi orientada a fazer massagens nas mamas para facilitar a descida do leite. Na MDER as puérperas que apresentaram esta dificuldade foram orientadas por nutricionista do banco de leite. Nos municípios de Oeiras e Uruçuí as puérperas, além da orientação de massageamento das mamas, contaram também com orientação e apoio dos Agentes Comunitários de Saúde (ACS). Quanto aos benefícios, foram informadas que a realização da pesquisa trará ganhos importantes para o conhecimento científico, para a gestão e profissionais do sistema de saúde, pela oportunidade de agregar conhecimento científico no que se refere à contaminação do leite materno pelo agrotóxico glifosato que possibilitará a tomada de decisões.

Dos três estabelecimentos de saúde onde a coleta de dados foi aplicada, A MDER foi o único a possuir comitê de ética em pesquisa (CEP). Em vista disso, além da autorização institucional expedida por seu diretor, a documentação relativa a esta pesquisa foi submetida ao CEP do referido estabelecimento que emitiu parecer de aprovação.

Face ao limitado tempo de aplicação da pesquisa de campo, as dificuldades enfrentadas na extração de leite da maioria das puérperas internadas na MDER e ao tamanho da amostra, a pesquisa foi submetida também ao comitê de ética em pesquisa da Fundação Municipal de Saúde de Teresina (FMS), que também emitiu documento de aprovação através de Memorando CEP/FMS 61/2016 para que a pesquisa de campo fosse descentralizada para as equipes de saúde da família (ESF) de Teresina de forma complementar para aquelas que tiveram parto na MDER e ainda se encontravam no período puerperal (REZENDE, 2005). Para isto obteve-se os endereços das puérperas nas declarações de nascidos vivos (DNV) junto à MDER.

Nos demais estabelecimentos de pesquisa, a autorização institucional foi suficiente, sendo feito apenas contatos prévios à pesquisa de campo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE GLIFOSATO, AMPA e FMOC

O glifosato é um agrotóxico derivado da glicina, assim como seu derivado AMPA, apesar de abolido seu uso em diversos países, o Brasil ainda o utiliza, sendo uma das principais fontes de intoxicação humana no meio rural (CURWIN *et al.*, 2007). A maioria dos estudos para a detecção de ambas as substâncias químicas em alimentos, água e líquidos corporais humanos por cromatografia líquida (particularmente acoplada ao espectrômetro de massas) (TUSH, LOFTIN, MEYER, 2013; BOTERO-COY *et al.*, 2013) utilizam soluções tampões para evitar estas dissociações, evitando assim análise falso negativa em sua detecção. A estrutura química do glifosato é iônica devido ao grupamento fosfato de fácil dissociação e por não possuir componentes químicos capazes de absorver radiação ultravioleta (cromóforo) em comprimentos de onda acima de 210 nm sua detecção por cromatografia líquida acoplada a detectores que utilizam a radiação ultravioleta é inviável.

Grupos protetores são empregados nas mais diversas reações químicas a fim de proteger grupos funcionais em diferentes etapas de uma síntese orgânica como a empregada na produção de fármacos. São versáteis e muito utilizados também a cromatografia para a derivatização de substâncias instáveis e de difícil detecção. Agentes como Bsfta (N,O-Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) e Tmsc (cloreto de rimetilsilano) (NGIM, *et al.*, 2011) são amplamente empregados em cromatografia gasosa para tornar moléculas menos polares e mais voláteis, enquanto que grupos derivatizantes como FMOC tornam moléculas orgânicas mais estáveis e adicionam o grupo cromóforo a grupos aminos através de reação de substituição de hidrogênio do grupo amino por grupamento fluorenilmetil metoxicarbonila (KHROLENKO; WIECZOREK, 2005).

As soluções padrões de glifosato e AMPA foram analisadas por CLAE acoplada a detector de radiação ultravioleta com arranjo de fotodiodos, através de gradiente exploratório tendo como solvente A, tampão fosfato 100 mM com pH 10, e o solvente B sendo acetonitrila nas seguintes proporções: 5% de B por 3 minutos, seguidos de um gradiente linear por 60 minutos até atingir 100 % B, sendo esta proporção mantida por 15 minutos, perfazendo um total de 78 minutos de análise cromatográfica, em comprimento de onda de 263 nm na coluna Zorbax[®] SB-CN 5µm 100A 150 x 4,6mm da Agilent, como mostra a Figura 2.

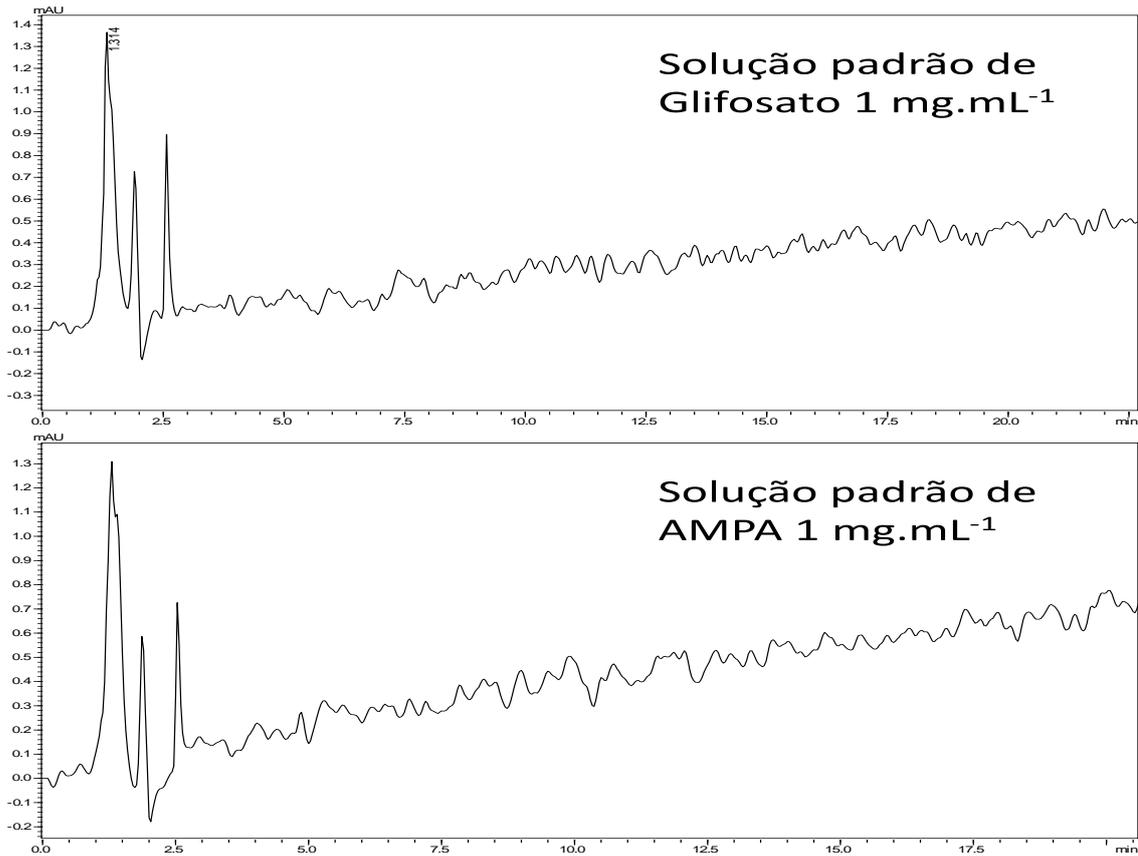


FIGURA 2 - CROMATOGRAMA OBTIDO DA ANÁLISE DAS SOLUÇÕES PADRÃO DO GLIFOSATO E AMPA (1mg.mL⁻¹). MÉTODO EXPLORATÓRIO, DETECÇÃO 263 nm.
FONTE: O Autor (2017)

Observou-se nos cromatogramas que tanto o glifosato quanto o AMPA não apresentaram picos cromatográficos, pois os mesmos não possuem cromóforos na região ultravioleta, bem como no comprimento de onda selecionado (263 nm).

Entretanto o FMOC possui grupo funcional aromático conjugado ao grupo carbonila absorvendo radiação ultravioleta, sendo possível observar pico cromatográfico em 25,6 minutos e espectro de UV característico para moléculas como fluorenilmetil metoxycarbonila Figura 3.

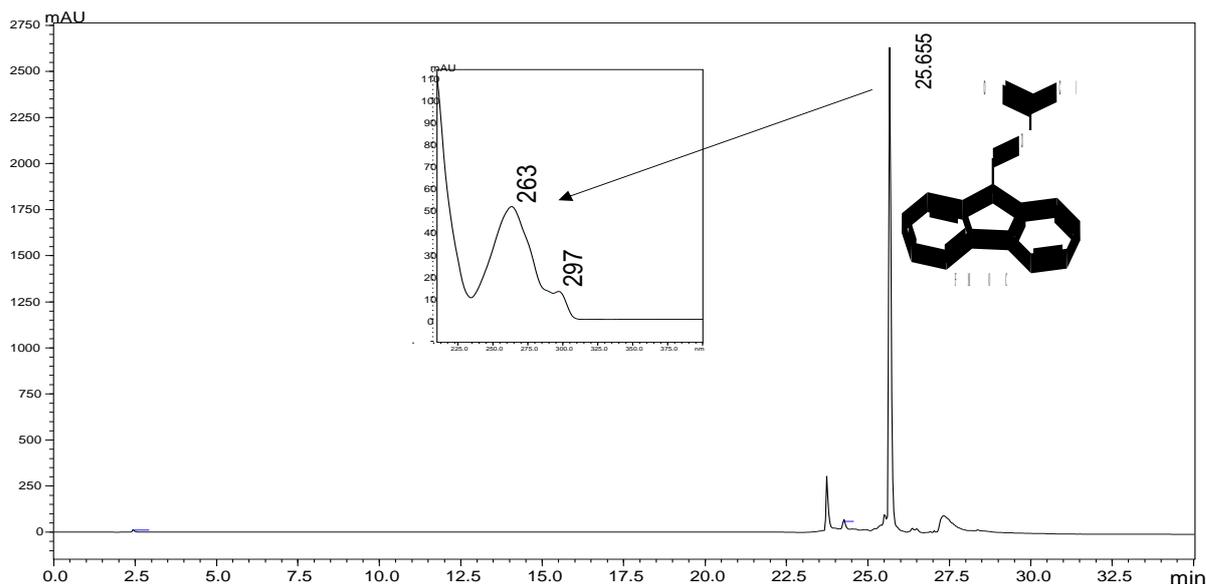


FIGURA 3 - CROMATOGRAMA OBTIDO DA ANÁLISE DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE FMOC EM (1mg. mL⁻¹). MÉTODO EXPLORATÓRIO, DETECÇÃO 263 nm.

FONTE: O Autor (2017)

A reação de derivatização do glifosato com FMOC foi realizada com o tampão borato e excesso de FMOC, a fim de garantir o bom andamento reacional e para a obtenção de produto derivatizado que foi utilizado para a construção da curva de calibração.

Como descrito anteriormente na Figura 2, o glifosato e o AMPA não possuem cromóforo, portanto não estão presentes no cromatograma obtido no comprimento de onda de 263 nm. Ao obter reação efetiva do produto, conforme Figura 4, o cromatograma apresentou detecção em pico cromatográfico no comprimento de onda de 263 nm, uma vez que o FMOC foi incorporado à molécula do glifosato e a diferenciação aconteceu entre a molécula de FMOC (Figura 3), e o complexo glifosato-FMOC se deu pela alteração da polaridade e consequentemente seu tempo de retenção no cromatograma.

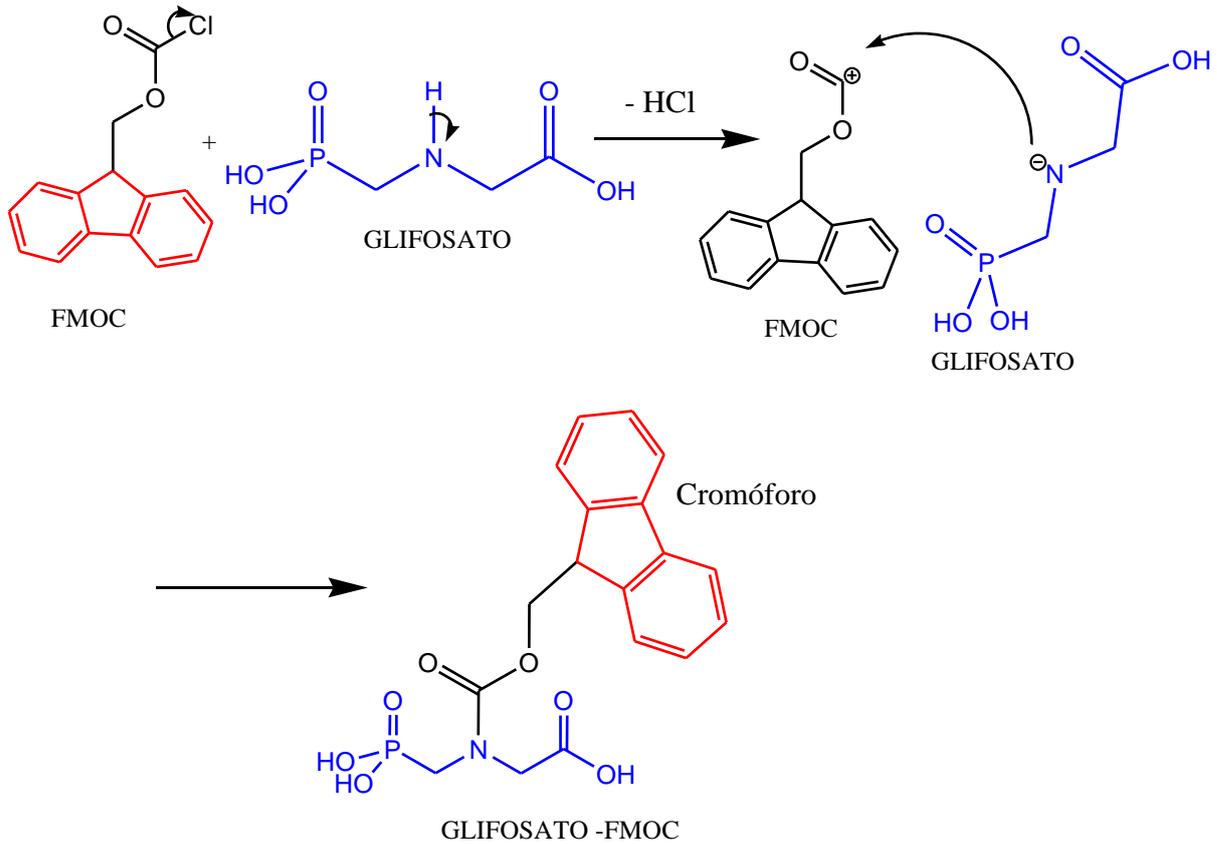


FIGURA 4 - REAÇÃO QUÍMICA ENTRE GLIFOSATO E FMOC, COM FORMAÇÃO DO COMPLEXO GLIFOSATO-FMOC COM INDICAÇÃO DO CROMÓFORO.
FONTE: CATRINCK (2014)

A Figura 5 mostra o cromatograma do produto obtido da fração aquosa da reação de derivatização, onde o pico cromatográfico em 14,1 minutos não aconteceu nos cromatogramas da Figura 2. A Figura 5 mostra ainda a presença de outro pico cromatográfico relevante em 27 minutos, referente ao FMOC que foi utilizado em excesso na reação. Com isto ficou demonstrado que a reação foi efetiva com a produção do complexo glifosato-FMOC.

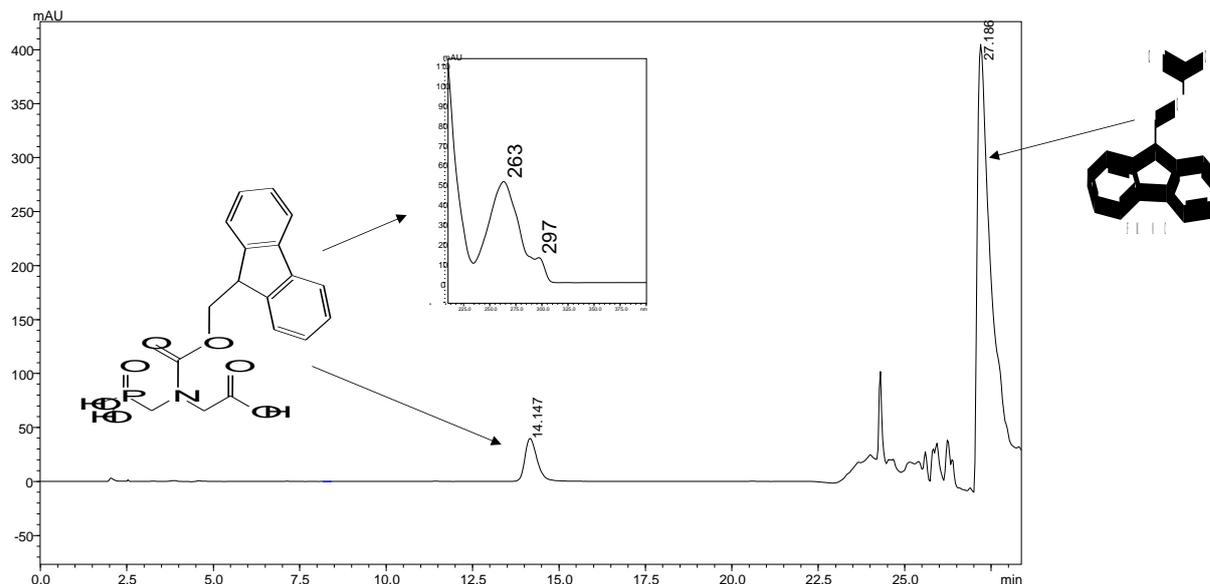


FIGURA 5 - CROMATOGRAMA DO PRODUTO OBTIDO DA FRAÇÃO AQUOSA DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO.

FONTE: O Autor (2017)

Observou-se ainda uma boa separação entre dois picos cromatográficos e para a obtenção de um complexo com maior grau de pureza, foi realizada uma separação utilizando extração de fase sólida com cartucho com octadecil (C₁₈ Chromabond[®]) retirando assim as impurezas do complexo que foi utilizado para a construção da curva de calibração utilizada para determinar a quantidade de glifosato nas amostras de leite materno.

Para isto as soluções produzidas a partir das soluções estoque do produto da reação na faixa de concentração de 15 a 90 mg.L⁻¹ para a construção de curvas analíticas de seis concentrações diferentes pelo método dos mínimos quadrados. Considera-se que um método é linear cujos resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito, respeitando a Lei de Lambert-Beer (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009). A Figura 6 mostra a curva obtida através das análises em triplicatas das seis concentrações, enquanto que a Tabela 1 mostra os parâmetros estatísticos obtidos a partir das análises feitas em cromatógrafo líquido em triplicata para cada solução de análise.

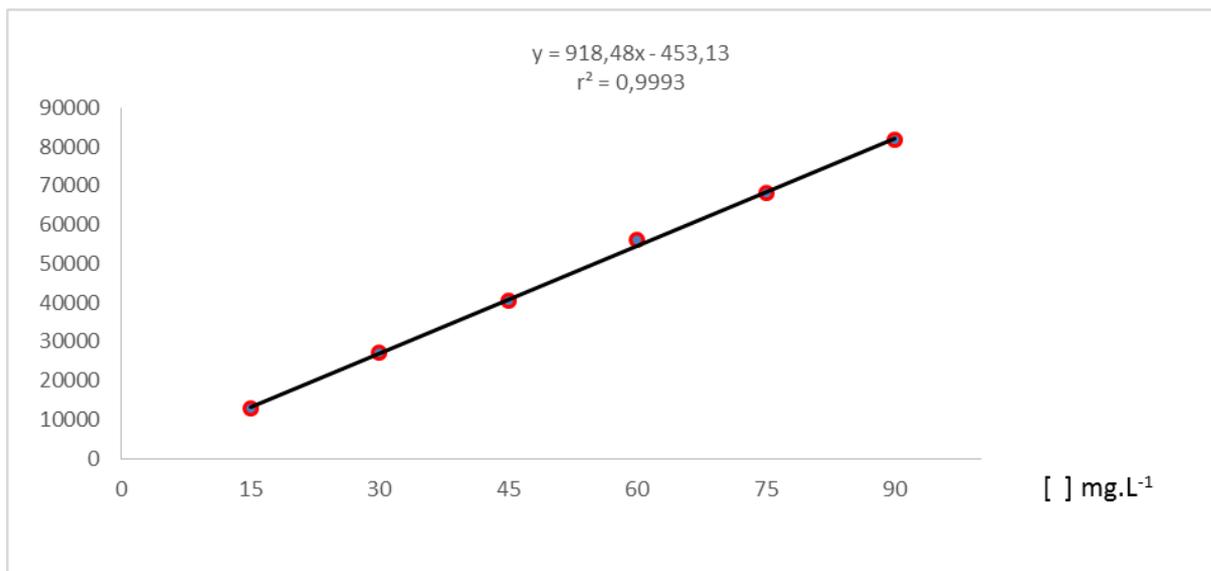


FIGURA 6 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO FMOC-CI OBTIDO COM *CLEAN UP* DA FRAÇÃO AQUOSA DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DO GLIFOSADO ATRAVÉS DAS ANÁLISES EM TRIPPLICATAS DAS SEIS CONCENTRAÇÕES.

FONTE: O Autor (2017)

TABELA 1 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DAS CURVAS ANALÍTICAS DO COMPLEXO GLIFOSATO E CLOROFORMATO DE 9 FLUORENILMETILA (GLIFOSATO-FMOC).

Concentração (µg.mL ⁻¹)	Média das Áreas (n=3)	DP	CV(%)
15	12893,0	615,15	4,77
30	27225,0	1643,60	6,03
45	40653,3	400,83	0,98
60	55976,3	1803,76	3,22
75	68123,3	2731,74	4,01
90	81727,0	2631,01	3,21

FONTE: O Autor (2017)

LEGENDA: CV – Coeficiente de Variação; DP – Desvio Padrão.

Considera-se um método linear, aquele que gera resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, a linearidade deve ser avaliada com no mínimo cinco concentrações diferentes e o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99 (BRASIL, 2003). A Tabela 2 mostra os dados obtidos na regressão linear que demonstrou o coeficiente de correlação (r) igual a 0,9993 demonstrando que o método é linear (BRASIL, 2003).

TABELA 2 DADOS DA LINEARIDADE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) ACOPLADA A DETECTOR COM ARRANJO DE FOTODIODO.

PARÂMETROS	Glifosato-FMOC
Equação da regressão linear	$y=0,00027x-0,00131$
$\lambda(\text{nm})$ da curva analítica	
Inclinação (a)	918,48
Intercepto (b)	-453,13
Coefficiente de correlação (r)	0,9993

FONTE: O Autor (2017)

Durante o desenvolvimento do método de quantificação do ácido aminometilfosfônico (AMPA) e análise das amostras derivatizadas, os métodos desenvolvidos mostraram-se bastante prejudiciais tanto às colunas cromatográficas utilizadas, quanto ao equipamento, fatos não constados na fase de detecção e construção da curva de calibração do glifosato. O desgaste se deu principalmente na fase estacionária das colunas por causa do alto valor de pH da fase móvel ($\text{pH} > 10 \pm 0,1$) e pela característica da amostra, uma matriz complexa com diversos tipos de substâncias, particularmente aminoácidos e proteínas. Santos Neto (2009) relata que soluções tampão podem gerar problemas de corrosão, abrasão, cristalização e até mesmo o crescimento de microorganismos em sistemas de cromatografia líquida. A coluna que vinha sendo utilizada não apresentou mais reprodutibilidade cromatográfica e por isso foi necessária a troca da mesma por outra existente na UFPI do tipo Kinetex 5 μm EVO C18 100A 250 x 4,6mm, onde foi feita toda análise de leite materno derivatizado. Tal substituição impossibilitou a quantificação das amostras do estudo, face a construção da curva de calibração ter sido feita na primeira coluna do tipo C₁₈ Zorbax SB-CN 5 μm 100A 150 x 4,6mm.

O tampão referendado tanto pela Farmacopeia Brasileira, quanto por Olívio *et al* (2015) precipitou em diversos momentos durante as análises das amostras e como o tampão preparado necessitava de ajustes com hidróxido de potássio 6 M e esse ajuste não foi uniforme, ocorreram alterações significativas dos tempos de retenção das substâncias de interesse (glifosato-FMOC e AMPA-FMOC), tornando os métodos empregados não reprodutíveis durante a análise das amostras, mesmo na nova coluna, o que inviabilizou a quantificação destas substâncias, mas não a sua detecção.

Antes dos problemas técnicos, tanto as soluções padrões de glifosato-FMOC, como AMPA-FMOC foram analisados, observando-se que a coluna C₁₈ (ambos a 1 mg.mL⁻¹) e seus

cromatogramas apresentaram boa resolução de análise, o que possibilitou identificar ambos os padrões que apresentaram tempos de retenção diferente ao mostrado na Figura 5 (p. 39). A Figura 7 mostra o cromatograma do produto obtido da fração aquosa da reação de derivatização, onde o pico cromatográfico em 4,8 minutos no método isocrático a 10% de B foi determinado como sendo do glifosato-FMOC (Figura 7A) e o pico cromatográfico em 6,5 minutos (Figura 7B) foi determinado como sendo do AMPA-FMOC pelo mesmo método a 20% de B, ambos na coluna C₁₈ Kinetex 5µm EVO C18 100A 250 x 4,6mm. A Figura 7 demonstra os dois cromatogramas obtidos das análises do glifosato-FMOC e AMPA-FMOC.

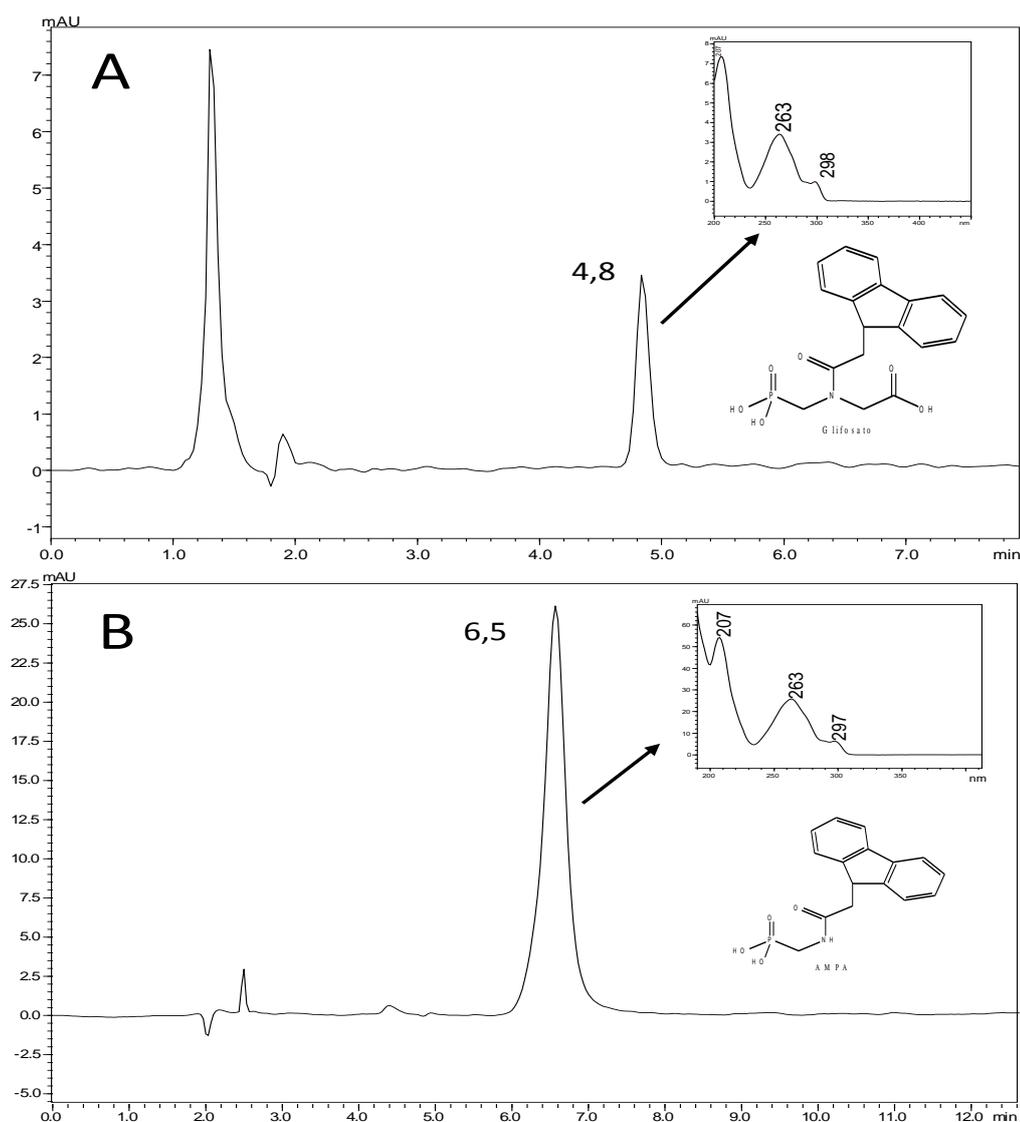


FIGURA 7 - CROMATOGRAMAS DO GLIFOSATO-FMOC (A) E AMPA-FMOC (B) DA FRAÇÃO AQUOSA DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO.
FONTE: O Autor (2017)

A Tabela 3 indica quais amostras derivatizadas foram analisadas para detecção de Glifosato-FMOC e AMPA-FMOC.

TABELA 3 AMOSTRAS DE LEITE MATERNO DERIVATIZADAS E ANALISADAS PARA DETECÇÃO DE GLIFOSATO-FMOC E AMPA-FMOC RELATIVAS AOS ESTABELECIMENTOS DE SAÚDE DE OEIRAS E URUCUÍ, PIAUÍ.

Amostras	Estabelecimento HRDC		Estabelecimento HRDA	
	Glifosato-FMOC	AMPA-FMOC	Glifosato-FMOC	AMPA-FMOC
LM-01	+	+	+	Na
LM-02	Nd	+	Nd	Nd
LM-03	Na	Na	+	+
LM-04	Na	Na	+	+
LM-05	Na	Na	+	+
LM-06	Na	Na	+	+
LM-07	Nd	Nd	Nd	+
LM-08	Na	+	Na	+
LM-09	Na	Na	Na	+
LM-10	Nd	Nd	+	+
LM-11	Na	Na	Na	+
LM-13	Na	Na	Nd	Na
LM-14	+	Nd	Na	Na
LM-16	+	+	Na	Na
LM-17	Nd	Nd	Na	Na
LM-19	Nd	Nd	Na	Na
LM-21	Nd	Na	Na	Na
LM-22	Nd	Nd	Na	Na
LM-23	Nd	Nd	Na	Na
LM-25	Nd	+	Na	Na

FONTE: O Autor (2017)

LEGENDA: (LM) Leite Materno; (+) Presente; (Na) Não analisado; (Nd) Não detectado.

Para o andamento das análises em condições adversas, verificou-se que o número de puérperas que trabalharam ou manejaram objetos com presença de agrotóxicos era maior na cidade de Uruçuí e menor na cidade de Oeiras. Com um número reduzido de amostras vindas destes dois locais de coleta, optou-se por estas para ser priorizadas e selecionadas aleatoriamente tanto para o processo de derivatização, quanto para a análise por CLAE-DAD.

Foram realizadas 25(62,5%) análises das 40 amostras coletadas nos dois municípios, tendo sido detectado 16 amostras (64%) contaminadas por glifosato, por AMPA ou pelas duas substâncias. Das 13 (48,1%) amostras analisadas referentes às puérperas do município de Oeiras, foi detectado contaminação por uma ou pelas duas substâncias em 6 (46,1%) amostras. Das 12 (92,3%) amostras analisadas do município de Uruçuí, 10 (83,4%) apresentaram contaminação por uma ou pelas duas substâncias. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas, conforme cromatogramas demonstrados nas Figuras 8 e 9 relativas

às análises dos dois municípios, sendo que a Figura 8 apresenta os cromatogramas das análises das amostras onde foi detectada a presença de glifosato-FMOC nas duas cidades, enquanto que a Figura 9 apresenta os cromatogramas das amostras onde foi detectado o AMPA-FMOC também nas duas cidades.

Das 27 amostras coletadas no município de Oeiras 11 foram analisadas tanto para detecção de glifosato, como do AMPA, 1 foi analisada apenas para glifosato e 1 analisada apenas para detecção do AMPA, houve perda de 7 amostras e outras 7 não foram analisadas.

No município de Uruçuí houve apenas uma perda e das 13 amostras coletadas, 7 foram analisadas tanto para detecção de glifosato, como do AMPA, 2 foram analisadas apenas para detecção de glifosato e 3 foram analisadas apenas para detecção do AMPA.

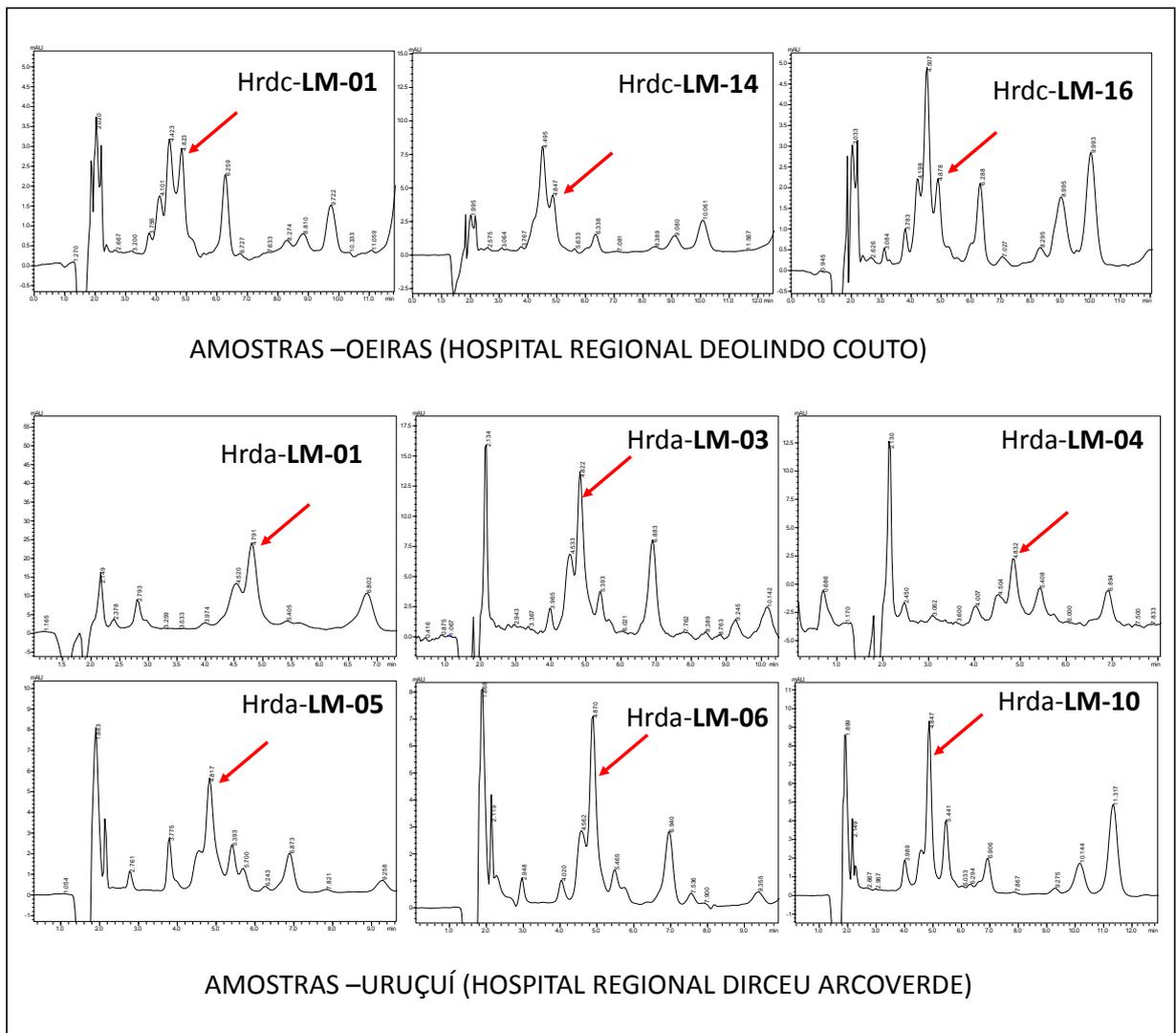


FIGURA 8 - CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE LEITE MATERNO COLETADAS NOS HOSPITAIS DEOLINDO COUTO (OEIRAS-PI) E DIRCEU ARCOVERDE (URUCUI-PI) DERIVATIZADAS COM FMOC E A INDICAÇÃO DO PICO CROMATOGRÁFICO REFERENTE AO GLIFOSATO.

FONTE: O Autor (2017)

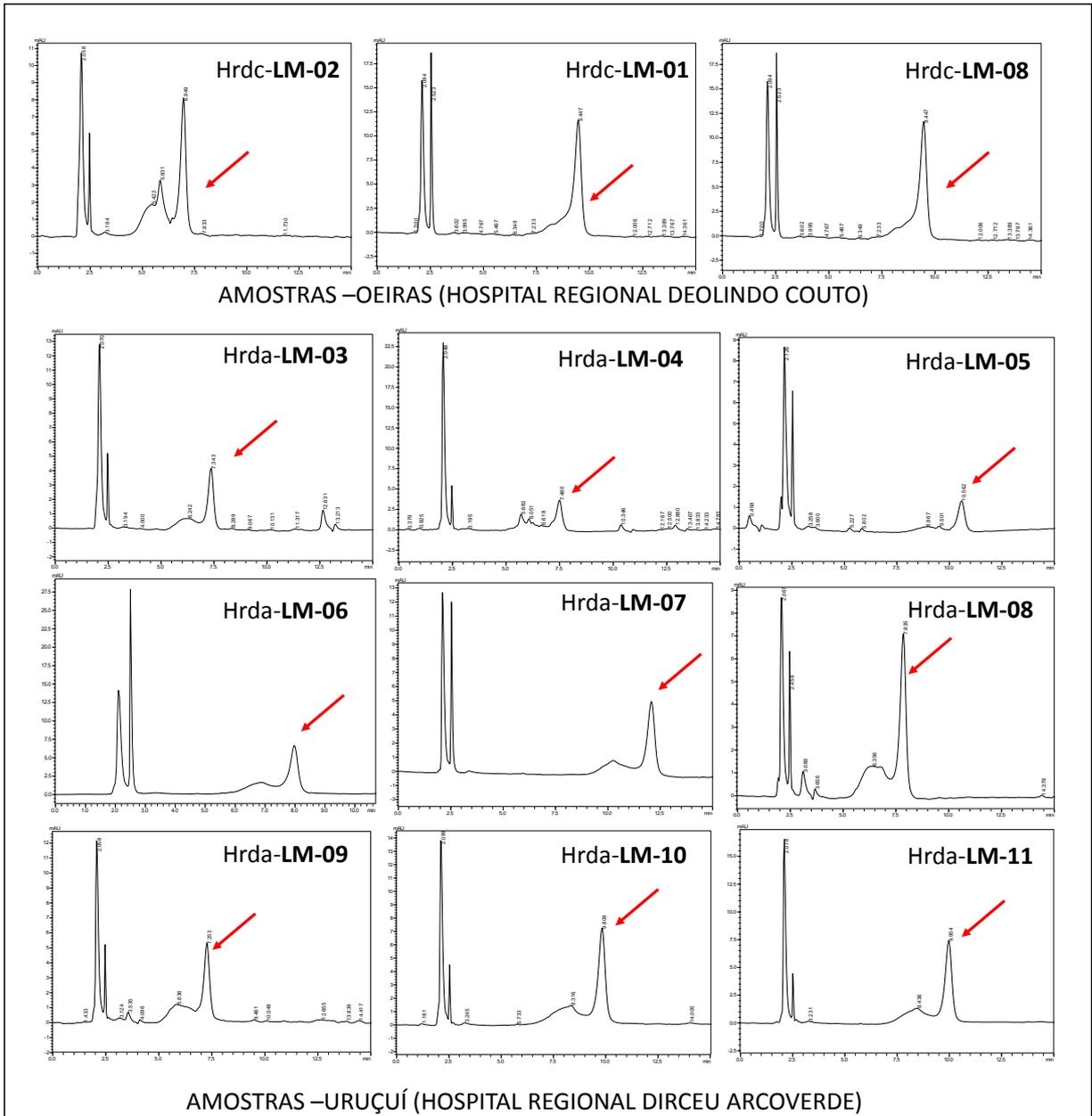


FIGURA 9 - CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE LEITE MATERNO COLETADAS NOS HOSPITAIS DEOLINDO COUTO (OEIRAS-PI) E DIRCEU ARCOVERDE (URUÇUÍ-PI) DERIVATIZADAS COM FMOC E A INDICAÇÃO DO PICO CROMATOGRÁFICO REFERENTE AO AMPA.

FONTE: Autor (2017)

Devido à forma aleatória de seleção das amostras destes dois municípios, não foi possível realizar análise das amostras de leite materno de puérperas que tiveram alguma forma de contato com agrotóxico, mas ficou constatada a presença tanto de glifosato-FMOC, como de AMPA-FMOC.

No hospital Regional Deolindo Couto (Oeiras) apenas 6 das 13 amostras analisadas apresentaram contaminação pelo agrotóxico glifosato ou seu derivado o AMPA, sendo que a amostra LM-01 apresentou contaminação das duas substâncias. Já as amostras advindas do Hospital Regional Dirceu Arcoverde (Uruçuí) apresentaram 10 amostras contaminadas por uma ou pelas duas substâncias em estudo.

O caráter parcial dos achados assemelha-se a estudos no Brasil (PALMA, 2011) e outros países (BEDI *et al.*, 2013; BERGKVIST *et al.*, 2012; CROES *et al.*, 2012; FUJII *et al.*, 2012; MANNETJE *et al.*, 2013; ROJAS-AQUELLA, *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2013) apenas no que se refere à detecção da contaminação do leite materno por agrotóxicos, impossibilitando comparativos quanto a limites mínimos e máximo de quantificação das substâncias analisadas.

O AMPA por ser um derivado primário da degradação ou metabolismo do glifosato, sua presença em leite materno demonstra a degradação do glifosato pelo metabolismo de plantas onde foi aplicado, particularmente na preservação do plantio da soja, podendo ainda demonstrar a degradação microbiológica do glifosato em água contaminada resultante de atividades econômicas desenvolvidas nas regiões de grandes áreas plantadas (PIAUI, 2013) como a cidade como Uruçuí onde a área plantada de soja respondeu no ano de 2016 por 64,2% de toda área plantada do grupo de lavoura temporária (BRASIL, 2017a). O contrário se esperava com as amostras provenientes de Oeiras por não ser área de cultivo agrícola (PIAUI, 2013), o que evidencia que a contaminação se deu em outras atividades ou fontes contaminantes (ABRASCO, 2015; LONDRES, 2011). Mesmo assim nos dois municípios se constatou importante percentual de amostras contaminadas pelo glifosato ou AMPA, coerentes com as atividades agrícolas nelas adotados.

Quanto ao município de Teresina, das 164 amostras coletadas 91(55,5%) referem-se a puérperas residentes em Teresina e 73 amostras provenientes de puérperas residentes 73(44,5%) municípios do Piauí, alguns destes situados em região de importante atividade econômica de cultivo de soja e outros produtos agrícolas, não sendo analisadas por pane operacional durante a fase de análise.

A presença do glifosato no leite materno indica que deve ocorrer uma contaminação direta por este agrotóxico ou que as quantidades utilizadas na atividade agrícola da região pode ser tão elevada que o excesso não foi degradado pelo metabolismo das plantas ou microbiológico (SCHUETTE, J., 1998), sugerindo novos estudos para quantificar o teor de glifosato e AMPA em alimentos produzidos, bem com nos mananciais e locais de fornecimento de água potável a população.

De forma análoga, a constatação da contaminação do leite materno pelo agrotóxico glifosato e seu principal metabólico AMPA em puérperas de municípios do Piauí consolida a ameaça que o crescimento econômico do binômio atividade agrícola versus consumo de agrotóxicos representa para a saúde da mulher e da criança, sugerindo ser incorporado ao planejamento e prioridades do sistema de saúde como problema de saúde pública universal, tanto pelos achados neste estudo em municípios de alta e baixa atividade agrícola do Piauí, como estudo realizado no Brasil (PALMA, 2011) e em outros países (BEDI *et al.*, 2013; BERGKVIST *et al.*, 2012; CROES *et al.*, 2012; FUJII *et al.*, 2012; MANNETJE *et al.*, 2013; ROJAS-AQUELLA, *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2013).

Os resultados demonstraram importante prevalência da contaminação do leite materno de puérperas de municípios do Piauí pelo agrotóxico glifosato, sua relevância enquanto fator de risco à saúde da mulher e da criança, podendo servir de subsídio para a tomada de decisão e intervenção pelo poder público do sistema de saúde.

5.2 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DAS PARTICIPANTES E FILHOS

Os trabalhos de campo resultaram na adesão espontânea de 204 puérperas, sendo 164 vinculadas à MDER, 27 ao HRDC e 13 vinculadas ao HRDA. Estas forneceram informações sociodemográficas tanto de si, com de seus respectivos filhos.

As informações sociodemográficas foram constituídas de 12 características previamente estabelecidas no Apêndice C para puérpera (Idade, Cor da Pele, Escolaridade, Estado Civil, Renda Individual, Renda Familiar, Região onde Mora, Região onde Trabalha, Contato com Agrotóxicos, Adoeceu por Intoxicação, Nº de Gestações e Nº de Aborto), e 4 características constante no Apêndice D para criança (Sexo, Peso ao Nascer, Semanas de Gestação e Situação de Saúde ao Nascer). A demonstração destes resultados encontra-se na Tabela 4 com frequências absolutas e relativas estratificadas por estabelecimento pesquisado.

TABELA 4 FREQUÊNCIA ABSOLUTA E RELATIVA DOS DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E ECONÔMICOS DE PUÉRPERAS PARTICIPANTES DO ESTUDO NOS MUNICÍPIOS DE TERESINA, OEIRAS E URUÇUI, PIAUÍ, 2017

Características / Estabelecimentos (Municípios)	MDER(Teresina)		HRDC(Oeiras)		HRDA(Uruçuí)		Total	
	N = 164	%	N = 27	%	N = 13	%	N=204	%
Idade (em anos)								
14 a 19	36	22	7	25,9	3	23,1	46	22,5
20 a 44	128	78	20	74,1	10	76,9	158	77,5
Cor da Pele Informada								
Branca	20	12,2	1	3,7	0	0	21	10,3
Parda	114	69,5	24	88,9	12	92,3	150	73,5
Preta	22	13,4	2	7,4	1	7,7	25	12,3
Amarela	7	4,3	0	0	0	0	7	3,4
Indígena	1	0,6	0	0	0	0	1	0,05
Escolaridade								
Não Alfabetizada	1	0,6	0	0	0	0	1	0,05
Ensino Fundamental Incompleto	42	25,6	8	29,6	2	15,4	52	25,5
Ensino Fundamental Completo	54	32,9	3	11,1	2	15,4	59	28,9
Ensino Médio Completo	58	35,4	14	51,9	9	69,2	81	39,7
Ensino Superior Completo	8	4,9	0	0	0	0	8	3,9
Pós-Graduada	1	0,6	2	7,4	0	0	3	1,5
Estado Civil								
Solteira	39	23,8	8	29,6	4	30,8	51	25
Casada	34	20,7	10	37,1	2	15,4	46	22,5
União Estável	88	53,7	9	33,3	7	53,8	104	51
Separada / Divorciada	2	1,2	0	0	0	0	2	1
Viúva	1	0,6	0	0	0	0	1	0,5
Renda Individual								
Sem Renda	71	43,3	11	40,7	4	30,8	86	42,2
0<SM<=1	85	51,8	14	51,9	9	69,2	108	52,9
1<SM<=2	7	4,3	2	7,2	0	46,1	9	4,4
SM>2	1	0,6	0	0	0	0	1	0,5
Renda Familiar								
Sem Renda	17	10,4	0	0	0	0	17	8,3
0<SM<=1	69	42,1	15	55,6	4	30,8	88	43,1
1<SM<=2	56	34,1	8	29,6	2	15,4	66	32,4
SM> 2	22	13,4	4	14,8	7	53,8	33	16,2

Continua na próxima página

Continuação da Tabela 4

Características / Estabelecimentos (Municípios)	MDER (Teresina)		HRDC (Oeiras)		HRDA (Uruçuí)		Total	
	N = 164	%	N = 27	%	N = 13	%	N=204	%
Região onde Mora								
Zona Urbana	122	74,4	23	85,2	10	76,9	155	76,0
Zona Rural	41	25	0	0	2	15,4	43	21,0
Maior Parte na Zona Urbana	1	0,6	3	11,1	1	7,7	5	2,5
Maior Parte na Zona Rural	0	0	1	3,7	0	0	1	0,5
Região onde Trabalha								
Zona Urbana	122	74,4	22	81,5	10	76,9	154	75,5
Zona Rural	40	24,4	1	3,7	2	15,4	43	21,1
Maior Parte na Zona Urbana	1	0,6	4	14,8	1	7,7	6	2,9
Maior Parte na Zona Rural	1	0,6	0	0	0	0	1	0,5
Contato com Agrotóxico								
Trabalha manejando agrotóxico glifosato	0	0	0	0	0	0	0	0
Trabalha manejando outros agrotóxicos	0	0	1	3,7	0	0	1	0,5
Maneja objetos usados no trabalho com agrotóxicos	2	1,2	1	3,7	4	30,8	7	3,4
Não maneja agrotóxicos, mas vive próximo a estes produtos	6	3,7	0	0	3	23,0	9	4,4
De vez em quando se aproxima de local com agrotóxico	9	5,5	0	0	0	0	9	4,4
Não tem contato com agrotóxico	147	89,6	25	92,6	6	46,2	178	87,3
Desconhece o que é agrotóxico	0	0	0	0	0	0	0	0
Adoeceu por Intoxicação								
Sim	8	4,9	1	3,7	1	7,7	10	4,9
Não	156	95,1	26	96,3	12	92,3	194	95,1
Desconhece o que é agrotóxico	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Número de Gestações								
1	62	37,8	8	29,6	5	38,4	75	36,8
2	35	21,3	15	55,6	3	23,1	53	26
3	45	27,5	2	7,4	2	15,4	49	24
4	9	5,5	1	3,7	1	7,7	11	5,4
5+	13	7,9	1	3,7	2	15,4	16	7,8

Continua na página seguinte

Continuação da Tabela 4

Características / Estabelecimentos (Municípios)	MDER (Teresina)		HRDC (Oeiras)		HRDA (Uruçuí)		Total	
	N = 164	%	N = 27	%	N = 13	%	N=204	%
Número de Aborto								
0	122	74,7	23	85,2	10	76,9	155	76
1	32	19,5	3	11,1	1	7,7	36	17,6
2	8	4,9	0	0	1	7,7	9	4,4
3	2	1,2	0	0	0	0	2	1
4	0	0	0	0	1	7,7	1	0,5
5+	0	0	1	3,7	0	0	1	0,5
Sexo da Criança*								
Masculino	106	63,1	11	40,7	8	57,1	125	59,8
Feminino	62	36,9	16	59,3	6	42,9	84	40,2
Peso ao Nascer								
Inferior a 2500g (BPN)	44	26,2	0		1	14,3	35	16,7
2500+ (Normal)	124	73,8	27	100	13	85,7	162	77,5
Semanas de Gestão								
Até 36	53	32,3	1	3,7	0	0	54	26,5
37+	111	67,7	26	96,3	13	100	150	73,5
Situação de Saúde ao Nascer								
Nasceu com malformação	0	0	0	0	0	0	0	0
Nasceu com problemas respiratórios	10	5,9	0	0	3	21,4	13	6,2
Nasceu Saudável	104	61,9	27	100	11	78,6	142	67,9
Prematuridade	51	30,4	0	0	0	0	51	24,4
Arritmia	1	0,6	0	0	0	0	1	0,5
Billirrubina	1	0,6	0	0	0	0	1	0,5
Infecção urinária	1	0,6	0	0	0	0	1	0,5

FONTE: Pesquisa de Campo (2017)

LEGENDA: SM=salário mínimo 2017 R\$ 937,00; *1 gêmeo Masc e 3 gêmeo Fem. na MDER e 1 gêmeo sex diferente no HRDA; BPN = Baixo Peso ao Nascer, N=209

A característica idade revelou que a proporção de puérperas na faixa etária adolescente foi de 22,5%, superando a proporção nacional e da região nordeste que é de 18,8 e 21,8%, respectivamente (BRASIL, 2017b).

No aspecto cor da pele, as puérperas pardas foram maioria nos três estabelecimentos pesquisados, seguidas das pretas, brancas, amarelas e indígenas. Estes achados inverteram a posição entre pretas e brancas em relação ao resultado do censo IBGE 2010 do Piauí (BRASIL, 2017c).

O nível de instrução revelou que praticamente todas as puérperas detêm algum nível de estudo, evidenciando importante redução nas taxas de analfabetismo do Brasil, da Região Nordeste e do Piauí, (BRASIL, 2015e)

Na característica estado civil, as puérperas solteiras e as com vida conjugal em regime de união estável apresentaram proporções nos três estabelecimentos superiores à nacional que é de 19 e 22%, respectivamente. As casadas foram superiores à proporção nacional de 35,1% apenas no HRDC (BRASIL, 2016a).

No que se refere à renda individual, evidenciou-se a condição de extrema pobreza em importante parcela das puérperas, ao revelar que 43,3% na MDER, 40,7% no HRDC e 30,8% no HRDA não possuíam renda no ato da pesquisa, mais da metade sobrevivem com menos de um salário mínimo. Ao analisar a renda no grupo familiar, observou-se que na MDER as puérperas sem renda continuaram com importante representação ao responder pelo terceiro lugar, com discreto deslocamento nos três estabelecimentos para a faixa seguinte de renda familiar até um salário mínimo. Tal situação econômica se apresenta abaixo da renda constatada através da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) no ano de 2015 (BRASIL, 2016a).

Os resultados da característica Região onde Mora e Região onde Trabalha demonstram a tendência crescente de urbanização residencial e laboral das puérperas nos três grupos de estabelecimentos pesquisados, superior à proporção de 67,1% do Piauí constatada pela PNAD 2015 (BRASIL, 2016a).

Ao serem indagadas se já tinham tido contato com Agrotóxico, apenas o grupo de Uruçuí com 30,8% das participantes relatou manejar objetos usados no trabalho com tais substâncias, seguido das que não manejavam, mas viviam próximas a estes produtos com 23%, e as demais puérperas relataram não ter contato com agrotóxicos. Praticamente todas as puérperas dos municípios de Teresina e Oeiras relataram não ter contato com agrotóxicos.

Ao analisar a variável Adoeceu por Intoxicação, apenas no município de Uruçuí houve confirmação por 7,7% das puérperas, enquanto que nos demais municípios esta confirmação ficou inferior a 5%.

Nas duas variáveis anteriores é possível haver viés de informação por parte das participantes, podendo ser tanto por desinformação sobre sinais e sintomas de intoxicação por agrotóxicos, como pela possibilidade de intoxicação assintomática.

Sobre o número de gestações, as primíparas foram maioria em Teresina e Uruçuí, e em Oeiras houve maioria para as puérperas com duas gestações. Gestações primíparas foram as mais presentes em recente estudo sobre contaminação de leite materno por agrotóxicos (PALMA, 2011).

No que se refere ao número de aborto, 25,3% das puérperas de Teresina relataram ter tido entre 1 e 4, seguido das puérperas de Uruçuí com 23,1%. Estes achados encontram-se acima dos encontrados por Palma (2011). O percentual de aborto em Oeiras foi 11,1%, considerado coerente com a região de menor consumo de agrotóxico (PIAUI, 2013).

Das informações relacionadas à criança, a característica sexo revelou maioria para o gênero masculino nos grupos de puérperas dos municípios de Teresina e Uruçuí, coerentes com parâmetros esperados para a razão de sexo ao nascer (BRASIL, 2016a), diferente do município de Oeiras, onde o sexo feminino foi maioria.

Os resultados da característica Peso ao Nascer demonstraram importante proporção de crianças com baixo peso nos grupos de Teresina (26,2%) e Uruçuí (14,3%). O baixo peso ao nascer é definido pela OMS (apud (PEDRAZA, 2014) como todo nascimento vivo com peso ao nascer inferior a 2.500g, sendo fatores determinantes a prematuridade geralmente atrelada a fatores maternos e retardo de crescimento intrauterino associado a fatores socioeconômicos desfavoráveis. As proporções constatadas em Teresina e Uruçuí são características de países subdesenvolvidos e bem acima de prevalência nacional.

Para a característica Semana de Gestação, apenas o grupo de puérperas da MDER apresentou proporção de crianças com idade gestacional prematura o triplo da referência nacional (BRASIL, 2017b).

A última característica estudada foi a Situação de Saúde da criança ao Nascer. Nesta, o grupo de crianças de puérperas vinculadas ao estabelecimento MDER revelou que 37,4% nasceram com algum problema de saúde, seguidos por 15,4% das crianças de puérperas do estabelecimento HRDA. Todas as crianças de puérperas do estabelecimento HRDC nasceram saudáveis.

6 CONCLUSÃO

O perfil sociodemográfico das puérperas participantes deste estudo demonstra maior parte do tempo de vida e trabalho em área urbana, baixa renda individual e familiar, baixa escolaridade, sem contato, nem adoecimento por intoxicação de agrotóxico. Estas duas últimas características sinalizam pouco conhecimento das puérperas com os efeitos de interações humanas com agrotóxico, não podendo ser confirmado neste estudo face aos problemas técnico-operacionais apresentados na fase de análise das amostras de leite materno

O método de derivatização gradiente isocrático mostrou-se eficiente na fase de construção experimental por apresentar coeficiente de linearidade superior ao corte preconizado, sendo o método escolhido para a detecção do agrotóxico glifosato e seu derivado ácido aminometilfosfônico (AMPA) nas amostras de leite materno, tendo ficado limitado à detecção das duas substâncias pela necessidade de substituição de coluna cromatográfica usada na fase de testes experimentais e construção da curva de calibração por outra de configuração diferente.

A detecção do glifosato e do AMPA em algumas amostras de leite materno evidencia tanto a degradação do glifosato pelo metabolismo das plantas onde foi aplicado, como fator de risco de contaminação direta do leite materno pelo glifosato, principalmente em município como Uruçuí que possui grandes áreas de plantio de soja, ou por aplicação em quantidade excessiva desse agrotóxico, sugerindo a continuidade de estudos que expresse a quantificação da contaminação, já que sua presença se encontra confirmada neste estudo.

Conclui-se que contaminação do leite materno pelo agrotóxico glifosato comprova sua gravidade e importância enquanto fator de risco à saúde da mulher e da criança, merecendo ser incorporada na agenda de prioridade das políticas do sistema de saúde.

7 PERSPECTIVAS

Espera-se continuar o aprimoramento do método adotado neste estudo quanto aos aspectos de reprodutibilidade e quantificação de agrotóxicos em amostras de leite materno. Tal continuidade requer provimento de aporte financeiro para suportar o ônus requerido para se desenvolver pesquisa deste porte, quer em reposição ou incremento de equipamentos e insumos de laboratório, quer para custear a pesquisa de campo.

O método construído que analisou as amostras de leite materno é um produto do conhecimento que fica à disposição do sistema de saúde, pesquisadores, estudantes e demais interessados. Espera-se a gestão do sistema de saúde incorpore este método nos laboratórios especializados, passe a monitorar a contaminação do leite materno por agrotóxicos e adote providências para mitigar os efeitos maléficos que estes possam causar à saúde humana.

REFERÊNCIAS

- ABRASCO. Associação Brasileira de Saúde Coletiva. **Dossiê. um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde** / Organização de Fernando Ferreira Carneiro, Lia Giraldo da Silva Augusto, Raquel Maria Rigotto, Karen Friedrich e André Campos Búrigo. - Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624p.
- _____. Associação Brasileira de Saúde Coletiva. **Nota técnica sobre microcefalia e doenças vetoriais relacionadas ao Aedes aegypti: os perigos das abordagens com larvicidas e nebulizações químicas – fumacê. Net.** Fevereiro de 2016. Disponível em <https://www.abrasco.org.br/site/noticias/institucional/nota-tecnica-sobre-microcefalia-e-doencas-vetoriais-relacionadas-ao-aedes-aegypti-os-perigos-das-abordagens-com-larvicidas-e-nebulizacoes-quimicas-fumace/15929/>. Acesso em 10.05.2017.
- ARANGO, H.G. **Bioestatística teórica e computacional.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- ALMEIDA FILHO, N.; Roquayrol, M.Z. **Elementos de Metodologia Epidemiológica – Análise de Dados Epidemiológicos em Epidemiologia & Saúde.** 6ª Ed. Rio de Janeiro. MEDSI. 2003. p.161-167.
- AMARANTE JUNIOR, O.P. de, et al. **Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação.** Revista Química Nova. Vol.25, Nº 4, 589.593. 2002.
- BATISTA, M.T.A. et. al. **Estudo dos efeitos do pesticida da glicina substituída sobre eritrócitos humanos.** Revista eletrônica de farmácia suplemento. Vol. 3(2). 2006, p.22-24.
- BEDI, J.S. et al. **Pesticide residues in human breast milk: Risk assessment for infants from Punjab, India.** Disponível online em 11.07.2013 em: <<http://pesquisa.bvsalud.org>>. Acesso em 15.05.2015.
- BERGKVIST, C. et al. **Occurrence and levels of organochlorine compounds in human breast Milk in Bangladesh.** Disponível on line em 30.04.2012 em: <<http://pesquisa.bvsalud.org>>. Acesso em 15.05.2015.
- BOTERO-COY, A. M. et al. **Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean.** Journal of Chromatography A, v. 1313, p. 157–165, 2013.
- BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei 7.802. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Net.** Brasília-DF, Julho de 1989, 8p. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm>. Acesso em 24.05.2015.

- _____. Presidência da República. Decreto nº 4074. **Net**. Regulamenta a Lei nº 7.802 que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm>. Acesso em 10.04.2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União**. Brasília, DF, de 29 de maio de 2003.
- _____. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama). **Produtos Agrotóxicos comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental** / Rafaela Maciel Rebelo et.al. Brasil. Ibama. 2010.
- _____. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010a.
- _____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. **Modelo de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. 1 ed.– Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 135p.
- _____. Ministério da Saúde/ Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466/2012. **Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos**. Brasília-DF. 2012a. 12p.
- _____. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. **Planilhas eletrônicas sobre vendas de Ingredientes Ativos por UF, 2000 a 2013. Net**. 2015. Disponível em: http://ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594&Itemid=546. Acesso em 23.06.2016.
- _____. Ministério do Meio Ambiente. **Convenção de Estocolmo. Net**. 2015a, 31p. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/smcq_seguranca/_publicacao/143_publicacao16092009113044.pdf>. Acesso em 10.07.2016.
- _____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde da criança: **aleitamento materno e alimentação complementar** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015b. 184 p. : il. – (Cadernos de Atenção Básica ; n. 23). Acesso em 07.09.2017.
- _____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Posicionamento do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos Agrotóxicos. Net**. 2015c. Disponível em:

http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf. Acesso em 21.03.2016.

- _____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (site eletrônico). **Índice Monográfico / Glifosato**. 2015d. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/G01%2B%2BGlifosato.pdf/6a549ab8-990c-4c6b-b421-699e8f4b9ab4>>. Acesso em 15.11.2016.
- _____. Ministério do Planejamento. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Rio de Janeiro : IBGE, 2015e. 352p. – (Estudos e pesquisas. Informação geográfica, ISSN 1517-1450 ; n. 10).
- _____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 2 v. : il.
- _____. Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão / Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Síntese de indicadores sociais : uma análise das condições de vida da população brasileira : 2016 / IBGE, Coordenação de População e Indicadores Sociais**. - Rio de Janeiro : IBGE, 2016a 146 p. - (Estudos e pesquisas. Informação demográfica e socioeconômica, ISSN 1516-3296 ; n. 36).
- _____. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Departamento de Informática do Sus. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. (Site). **Opções de seleção de Doenças e Agravos de Notificação. Hepatite e Meningite**. 2017. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29892234&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/menin>. Acesso em 02.08.2017.
- _____. Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão / Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal do ano de 2016 (Site)**. Brasília, 2017a. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612#resultado>. Acesso em 18.08.2017.
- _____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. **Saúde Brasil 2015/2016 : uma análise da situação de saúde e da epidemia pelo vírus Zika e por outras doenças transmitidas pelo Aedes aegypti [recurso eletrônico]**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017b. 386 p.: il.
- _____. Ministério do Planejamento. Desenvolvimento e Gestão / Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo IBGE 2010. (site). **População Residente por Cor ou Raça**. Tabela 136/Piauí. Brasília-DF, 2017c. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/136#notas-tabela>. Acesso em 25.07.2017.
- BUSS, P.M.; PELLEGRINI FILHO, A. **A Saúde e seus determinantes sociais**. Physis (online). 2007, vol.17. n.1, pp.77-93. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/physis/v17n1/v17n1a06.pdf>>. Acesso em 05.03.2016.

- CATRINCK, T. C. P. G. et al. **A simple and efficient method for derivatization of glyphosate and AMPA using 9-fluorenylmethyl chloroformate and spectrophotometric analysis.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 25, n. 7, p. 1194–1199, 2014.
- COLLINS, C.H., *et al.* **Introdução a métodos cromatográficos / Princípios de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.** Editora da Unicamp. 7ed. São Paulo. 1997, p.183-187. Série Manuais.
- CROES, K. et al. **Persistent organic pollutants (POPs) in human milk: A biomonitoring study in rural areas of Flanders (Belgium).** Disponível online em 26.07.2012 em: <<http://pesquisa.bvsalud.org>>. Acesso em 12.03.2016.
- CURWIN B. D. *et al.* **Pesticide dose estimates for children of Iowa farmers and non-farmers Environmental Research,** vol 105, p. 307-315, 2007.
- FUJII, Y. et al. **Comparative survey of levels of chlorinated cyclodiene pesticides in breast milk from some cities of China, Korea and Japan.** Disponível online em 27.06.2012 em: <<http://pesquisa.bvsalud.org>>. Acesso em 12.03.2016.
- IARC, International Agency For Research On Cancer; World Health Organization. **Monographs Volume 112:** evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. Lyon: IARC, 2015.
- KHROLENKO, M. V.; WIECZOREK, P.P.; **Determination of Glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with *p*-toluenesulphonyl chloride.** Journal of Chromatography A, v. 1093, p. 111–117, 2005.
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida.** – Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.190 p.
- MANNETJE, A. et al. **Current concentrations, temporal trends and determinants of persistent organic pollutants in breast milk of New Zealand women.** Disponível online em 15.05.2013 em: <<http://pesquisa.bvsalud.org>>. Acesso em 12.03.2016.
- MENDES, E.V. **As redes de atenção à saúde.** / Eugênio Vilaça Mendes. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2011.549 p.: il.
- NEDELKHOSKA, T.V.; LOW, G.K-C. **High performance liquid chromatographic determination of Glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenmethyl chloroformate.** Analytica Chimica Acta, v. 511, p. 145-153, 2004.
- NGIM, K. K. et. Al. **Optimized derivatization procedure for characterizing (Aminomethyl)phosphonic acid impurities by GC-MS.** Journal of Chromatographic Science, v. 49, p. 8-14, 2011.

- OLIVIO, V. E. et al. **Rapid method for determination of glyphosate in groundwater using high performance liquid chromatography and solid-phase extraction after derivatization.** *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, v. 10, n. 2, Apr./Jun., p. 287 – 297, 2015.
- OMS. World Health Organization. **Exposure to Highly Hazardous Pesticides: a Major Public Health Concern.** Geneva, 2010.
- OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Manual de vigilância da saúde de Populações expostas a agrotóxicos.** Brasília (DF); 1996.
- PALMA, D.C.A. **Agrotóxicos em leite humano de puérperas residentes em Lucas do Rio Verde – MT.** / Danielly Cristina de Andrade Palma. 2011. 104p.
- PEDRAZA, Dixis Figueroa. **Baixo Peso ao Nascer no Brasil: Revisão Sistemática de Estudos no Sistema de Informações sobre Nascidos vivos.** *Revista de Atenção à Saúde*, v. 12, n° 41, jul./set. 2014, p.37-50.
- PIAUI. Governo do Estado do Piauí. Lei complementar nº 87. **Define o Estado em 4 macrorregiões de saúde e 11 territórios de desenvolvimento.** Piauí. 2007.
- _____. Secretaria Estadual de Saúde do Piauí. **Vigiagrotóxico: qualificação de equipes municipais de saúde.** (Agrotóxicos: não comer, nem beber; a saúde agradece) / Secretaria de Saúde do Estado. Teresina: Ed.SESAPI, 2013. 285p.
- _____. Secretaria Estadual de Desenvolvimento Rural / Agência de Defesa Agropecuária. **Banco de Dados de Cadastro de Comercialização de Agrotóxicos em municípios do Piauí.** 2014. 623 cadastros.
- PORTUGAL. Comité Português para a UNICEF / Comissão Nacional *Iniciativa Hospitais Amigos dos Bebés.* **Manual de Aleitamento Materno.** Lisboa. Ed. Revista 2012.
- REZENDE, J. de. **Puerpério.** 10ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2005. p. 387 a 393.
- RODRIGUES, H.G., et.al. **Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – uma breve revisão.** *Revista biotemas.* 2009, p. 7-16.
- ROJAS-SQUELLA, X. et al. **Presence of organochlorine pesticides in breast milk samples from Colombian women.** Disponível online em 15.03.2013 em: <<http://pesquisa.bvsalud.org>>. Acesso em 12.03.2016.
- SANTOS NETO, A.J. dos. **Uma visão técnica para a compreensão e resolução de problemas em sistemasde cromatografia líquida.** *Scientia Chromatographica*, v.1, n.2, 2009. p. 83-96.
- SCHRUBBERS, L. C., et al. **Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in leaves from Coffea Arabica using high performance liquid chromatography with quadrupole mass spectrometry detection.** *Talanta*, v.146, p. 609-620, 2016.

- SCHUETTE, J. Environmental fate of glyphosate. **Environmental Monitoring & Pest Management, Department of Pesticide Regulation Sacramento**, 1998.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2009.
- SONG, S. *et al.* **Residue levels of hexachlorocyclohexane and dichlorodiphenyltrichloroethane in human milk collected from Beijing**. National Research Center for Geoanalysis (NRCGA), 26 Bai Wan Zhuang Avenue, Xicheng District, Beijing100037, People's Republic of China. Disponível online em 26.01.2013 em: <<http://pesquisa.bvsalud.org>>. Acesso em 12.03.2016.
- SOUSA, V; DRIESSNACK, M.; MENDES, I., 2007. **Revisão dos desenhos de pesquisa relevantes para a enfermagem. Parte 1. Desenhos de pesquisa quantitativa**. Rev latino-am enfermagem. 2007. Maio-junho; 15(3).
- SOUZA, T. A. de, et al. **Estudo de Recuperação de glifosato e ampa derivados em solo utilizando-se resinas nacionais**. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Brasil, 2006.
- TUSH, D.; LOFTIN, K.A; MEYER, M.T. **Characterization of polyoxyethylene tallow amine surfactants in technical mixtures and glyphosate formulations using ultra-high performance liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1319, p. 80-87, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Em razão de está amamentando, você está sendo convidada a participar, de forma espontânea e na condição de participante, de uma pesquisa ora em andamento pelos pesquisadores que ao final também assinam este termo.

Esta pesquisa tem como objetivo, estudar possível presença de agrotóxico em leite materno de puérperas residentes no Piauí.

Em caso de seu aceite em participar, é necessário que você permita colher 10 mL de leite diretamente de sua mama. O material colhido será encaminhado em recipiente e condições adequadas para ser examinado em laboratório.

Além do Material, necessitamos também de informações a seu respeito para subsidiar a pesquisa, cujo formulário será preenchido no momento da coleta do leite.

Tanto o resultado do leite examinado, como seus dados pessoais serão preservados com absoluto sigilo, sendo os mesmos utilizados estritamente para atender os objetivos desta pesquisa.

Sua participação será de suma importância para conhecer se os agrotóxicos em uso se fazem presentes no leite materno e em qual dimensão, a fim de que sirva de referência para o avanço da ciência, e o único desconforto que você poderá sentir será no momento da coleta do leite. Se isto acontecer você será orientada a fazer massagem em toda mama para facilitar a descida do leite.

Como sua participação é espontânea não haverá retribuição material de qualquer espécie, como também você poderá desistir de participar a qualquer momento.

Em caso de dúvidas ou necessidade de informações complementares você pode manter contato com a pesquisadora através do telefone: 86-3215-5872, e-mail menesesoliveira@gmail.com, com o pesquisador assistente Inácio Pereira Lima, fone 86-99937-4454, e-mail inacioplima@hotmail.com. Pode ainda contatar o Comitê de Ética em Pesquisa, situado na Universidade Federal do Piauí / Campus Universitário Ministro Petrônio Portella – Pró-Reitoria de Pesquisa, Bairro Ininga, CEP-64049-550, fone/fax 86-3215-2332, e-mail cep.ufpi@ufpi.edu.br.

Considerando as informações contidas neste Termo, complementadas com informações verbais por ocasião do contato presencial, considero-me devidamente esclarecida e assino este Termo em duas vias consentindo minha condição de PARTICIPANTE desta pesquisa, sendo uma via minha e a outra para a pesquisadora.

Local e Data _____

Assinatura da PARTICIPANTE

Assinatura dos PESQUISADORES

APÊNDICE B TERMO DE ASSENTIMENTO

Em razão de está amamentando, você está sendo convidada a participar, de forma espontânea e na condição de participante, de uma pesquisa ora em andamento pelos pesquisadores que ao final também assina este termo.

Esta pesquisa tem como objetivo, estudar possível presença de agrotóxico em leite materno de puérperas residentes no Piauí.

Em caso de seu aceite em participar, é necessário que você permita colher 10 mL de leite diretamente de sua mama. O material colhido será encaminhado em recipiente e condições adequadas para ser examinado em laboratório.

Além do Material, necessitamos também de informações a seu respeito para subsidiar a pesquisa, cujo formulário será preenchido no momento da coleta do leite.

Tanto o resultado do leite examinado, como seus dados pessoais serão preservados com absoluto sigilo, sendo os mesmos utilizados estritamente para atender os objetivos desta pesquisa.

Sua participação será de suma importância para conhecer se os agrotóxicos em uso se fazem presentes no leite materno e em qual dimensão, a fim de que sirva de referência para o avanço da ciência, e o único desconforto que você poderá sentir será no momento da coleta do leite. Se isto acontecer você será orientada a fazer massagem em toda mama para facilitar a descida do leite.

Como sua participação é espontânea não haverá retribuição material de qualquer espécie, como também você poderá desistir de participar a qualquer momento.

Em caso de dúvidas ou necessidade de informações complementares você pode manter contato com a pesquisadora através do telefone: 86-3215-5872, e-mail menesesoliveira@gmail.com, com o pesquisador assistente Inácio Pereira Lima, fone 86-99937-4454, e-mail inacioplima@hotmail.com. Pode ainda contatar o Comitê de Ética em Pesquisa, situado na Universidade Federal do Piauí / Campus Universitário Ministro Petrônio Portella – Pró-Reitoria de Pesquisa, Bairro Ininga, CEP-64049-550, fone/fax 86-3215-2332, e-mail cep.ufpi@ufpi.edu.br.

Considerando as informações contidas neste Termo, considero-me devidamente esclarecida. Por ser menor de idade / considerada incapaz, dou meu assentimento para que meu(minha) _____ assine este Termo por mim em duas vias na condição de PARTICIPANTE desta pesquisa, sendo uma via minha e a outra para a pesquisadora.

Local e Data _____

Assinatura da PARTICIPANTE

Assinatura dos PESQUISADORES

**APÊNDICE C DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E ECONÔMICOS DA
PARTICIPANTE**

Estabelecimento de Saúde onde realizou o parto: nº ____ (1 MDER; 2 DRDC; 3 DRDA).

Município de Residência _____

Território de Desenvolvimento _____

MÃE Nº _____ Data da entrevista: ___/___/201__ ; Data da amostra: ___/ ___/ 201__

1. Idade: ____anos

2. grau de escolaridade

- Não alfabetizada
- Ensino fundamental incompleto
- Ensino Fundamental completo
- Ensino Médio completo
- Ensino Superior completo
- Pós-graduação

3. Cor da pele:

- Branca
- Parda
- Preta
- Amarela
- Indígena

4. Estado civil

- Solteira.
- Casada
- União estável
- Separada/divorciada
- Viúva

5. Renda individual: _____

6. Renda familiar: _____

7. Região de moradia:

- na zona urbana
- na zona rural
- maior parte do ano na zona urbana
- maior parte do ano na zona rural

8. Região de trabalho

- na zona urbana
- na zona rural

- maior parte do ano na zona urbana
- maior parte do ano na zona rural

9. Contato com o agrotóxico glifosato

- trabalha manejando agrotóxico glifosato
- trabalha manejando outros agrotóxicos
- maneja objetos usados no trabalho com agrotóxico
- não maneja agrotóxico, mas vive próximo a estes produtos
- de vez em quando se aproxima de local com agrotóxico
- não tem contato com agrotóxico
- Desconhece o que é agrotóxico

10. Adoeceu por intoxicação

- Sim
- Não
- Desconhece o que é agrotóxico

11. Número de gestações: _____

12. Número de aborto: _____

APÊNDICE D DADOS DA CRIANÇA**1. Sexo da criança**

() masculino

() feminino

2. Peso ao nascer: _____**3. Semanas de gestação: _____****4. Problema de saúde ao nascer**

() nasceu com malformação

() nasceu com problemas respiratórios

() nasceu saudável

() Outro. Especificar _____